

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

AF



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/11, C07K 14/81	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/58459 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Oktober 2000 (05.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/02148 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. März 1999 (29.03.99) (71)(72) Anmelder und Erfinder: ABTS, Harry, Frank [DE/DE]; Von-Bodelschwingh-Strasse 39, D-50259 Pulheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MICHEL, Günter [DE/DE]; Ringelsweide 14, D-40223 Düsseldorf (DE). (74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Strasse 10, D-40878 Ratingen (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: NUCLEIC ACID ENCODING A SERINE PROTEASE INHIBITOR (54) Bezeichnung: FÜR EINEN SERIN PROTEASE INHIBITOR CODIERENDE NUKLEINSÄURE (57) Abstract <p>The invention relates to a novel nucleic acid that encodes a serine protease inhibitor.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung lehrt eine neue, für einen Serin Protease Inhibitor codierende Nukleinsäure.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss den PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Für einen Serin Protease Inhibitor codierende Nukleinsäure

Störungen der Homöostase in der Haut finden sich bei malignen Hauttumoren wie dem Basaliom oder dem Plattenepithelkarzinom, aber auch bei benignen proliferativen Hauterkrankungen wie der Schuppenflechte (Psoriasis). Auf Expressionsebene dokumentiert sich dieser abnorme Phänotyp der beteiligten Keratinozyten durch eine veränderte Genexpression im Vergleich mit Keratinozyten in gesunder Haut. Einen direkten Einfluß auf die Genexpression in der Haut hat auch die ultraviolette (UV) Komponente des Sonnenlichts. Insbesondere das mittlere Spektrum der UV-Strahlung (UVB, 280-210 nm) ist verantwortlich für diesen Effekt in Keratinozyten. Neben akuten Effekten wie Sonnenbrand und Immunsuppression können als Langzeiteffekte Hauttumore entstehen. Die Verbindung zwischen UV-Strahlung und deregulierter Genexpression bei Hauterkrankungen läßt vermuten, daß Gene, die an der physiologischen UV-Antwort beteiligt sind, ebenfalls bei pathologischen Prozessen in der Haut von Bedeutung sind.

Die molekularen Vorgänge bei der physiologischen UV-Antwort und der UV-Karzinogenese sind nur unvollständig aufgeklärt und erst wenige Gene konnten in diesem Kontext identifiziert werden.

Bedingt durch die methodischen Ansätze wurde bisher der reprimierende Effekt auf die Genexpression der UV-Strahlung nicht systematisch erfaßt (1-3).

Der Familie der Serin-Proteinase-Inhibitoren (Serpine) beinhaltet hochmolekulare (40-60 kDa) Proteine mit einer einzigen Aminosäurekette, die durch eine hoch geordnete Tertiärstruktur charakterisiert ist. Definiert wird diese Tertiärstruktur durch α 1-Antitrypsin (α 1-P1) (5), dem Prototyp aller Serpine. Die aus 9 α -Helices und 3 β -Faltblättern bestehende Tertiärstruktur mit spezifischen Faltungseigenschaften ist elementar für die Funktion der Proteaseinhibitoren. Die inhibitorische Spezifität wird dabei in erster Linie durch die Aminosäureester in

P1-P1' Position im reaktiven Zustand nahe des C-Terminus des Proteins bestimmt. Dieser metastabile Zustand des Proteins macht infolge einer Interaktion mit dem reaktiven Zentrum einer Zielprotease eine Konformationsänderung durch und bildet schließlich einen kovalenten Serpin-Proteinase-Komplex (6).

- 5 Durch Aminosäurevergleiche, charakteristische Eigenschaften der Proteine und Genomorganisation konnte innerhalb der großen Serpinfamilie die Ovalbumin-Familie (Ov-Serpine) von intrazellulären Serpinen identifiziert werden (7).

Serpine sind an einer Vielzahl von wichtigen Proteinase-vermittelten physiologischen Funktionen wie Blutgerinnung, Fibrinolyse, Entzündung,
10 Zellmigration, Umbau extrazellulärer Matrix (8) sowie Aktivierung von Interleukin-Vorläufern (9) beteiligt.

Eine wachsende Zahl neuer Daten zeigt eine Beteiligung von Serpinen bei der Regulation von Proteinasen, die an Schlüsselstellen apoptotischer Vorgänge stehen (10-13). In humanen Keratinozyten sind Serpine, wie für PAI-1 gezeigt
15 (14), bei der Migration und Differenzierung von Zellen sowie im Kontext der Wundheilung von Bedeutung. Für PAI-2 konnte in Keratinozyten eine Beteiligung an intrazellulären Prozessen, die mit der terminalen Differenzierung und Bildung der verhornten Zellwand („cornified envelope“) in Zusammenhang stehen, demonstriert werden (15).

20

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Werkzeug zu finden, mittels welchem die eingangs genannten Krankheiten bzw. Effekte untersucht werden können und mittels welchem Wirkstoffe zur Behandlung dieser Krankheiten gefunden werden können.

25

Zur Lösung dieses Problems lehrt die Erfindung die Gegenstände der Ansprüche 1 bis 20. Als Allele sind durch Translokation, Punktmutation und/oder Deletion abgeleitete Gene bezeichnet. Als Homologe sind komplementäre bzw. hybridisierte Nukleinsäuren bezeichnet.

30

Durch die Anwendung der differentiellen mRNA Display Polymerase Kettenreaktion (DD-PCR) (4) boten sich hier neue Möglichkeiten zur Identifizierung und Klonierung UV-regulierter Gene. Ähnlich wie die subtraktive cDNA-Hybridisierung ist keine Kenntnis über die Sequenz der zu isolierenden Gene notwendig. Einzig ein quantitativer Unterschied der relevanten Sequenzen in den zu vergleichenden Zellpopulationen ist für die Identifizierung erforderlich. Dies ermöglicht die gleichzeitige Erfassung von bekannten und unbekannten Genen. Im Unterschied zur subtraktiven cDNA-Hybridisierung ist bei der DD-PCR die vergleichende Analyse nicht auf 2 Zellpopulationen beschränkt, sondern es können so viele Populationen nebeneinander analysiert werden, wie gleichzeitig gehandhabt werden können. Da zudem auch quantitative Unterschiede dargestellt werden können, ermöglicht dies die Erfassung der Expressionskinetik UV-regulierter Gene. Dabei können im Unterschied zu anderen Methoden zur gleichen Zeit sowohl UV-induzierte als auch UV-reprimierte Gene erfaßt werden.

Die vorliegende Anmeldung beschreibt die Identifizierung, Aufklärung und Analyse der vollständigen cDNA-Sequenzen eines neuen Serin-Protease-Inhibitors sowie seine Zuordnung als Familie der Ovalbumin-Serpine. Das neue Serpin ist in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT als UVB-reprimierbare Sequenz isoliert worden und wurde daher als „hurpin“ für HaCaT UV repressible serpin bezeichnet. Das Genom Data Base nomenclature committee hat für hurpin die systematische Bezeichnung proteinase inhibitor 13 (PI13) reserviert (confidential). Untersuchungen zur Expression zeigen, daß hurpin spezifisch in Keratinozyten exprimiert wird. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse auf eine Verknüpfung von hurpin mit der Proliferation und Aktivierung von humanen Keratinozyten hin. Weiterhin zeigt sich bei der Psoriasis eine deutliche Überexpression von hurpin in befallener Haut im Vergleich mit unbeefallener Haut.

Eine mögliche Funktion von hurpin in diesem Zusammenhang könnte die Verhinderung von apoptotischen Vorgängen in Keratinozyten sein.

Die Identifizierung eines neuen UV-reprimierbaren Serin-Protease-Inhibitors und die Assoziation mit einer benignen, proliferativen Hauterkrankung (Psoriasis) bietet Ansatzpunkte für:

- die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Erkrankung
- 5 • die Etablierung neuer klinischer Parameter zur Verlaufskontrolle
- die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien.

Im folgenden werden die Anwendungsbereiche der Erfindung näher erläutert:

- 10 Die ausschließliche Expression von hurpin in Keratinozyten läßt eine Funktion vermuten, die mit der spezifischen Aufgabe der Haut in Verbindung steht. Die bisherigen Daten weisen auf eine Beteiligung an Prozessen der Proliferation und Differenzierung der Haut hin. Die Differenzierung der Haut stellt eine spezielle Form des programmierten Zelltodes (Apoptose) dar. Entsprechend wird
- 15 für hurpin eine Rolle bei dieser speziellen Form von apoptotischen Vorgängen in der Haut postuliert. Allgemein kann damit von einer Rolle für hurpin in der Homöostase der Haut ausgegangen werden. Neben physiologischen Vorgängen die mit der Barrierefunktion der Haut verknüpft sind, schließt dies ebenfalls Vorgänge bei der Wundheilung und entzündlichen Vorgängen der Haut ein.
- 20 Hieraus ergibt sich ebenfalls eine Beteiligung von hurpin an pathologischen Störungen dieser Vorgänge wie bisher für die Psoriasis gezeigt. Dies schließt insbesondere Störungen der Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten im Rahmen der Karzinogenese epidermalen Tumoren ein.

25

Damit ergeben sich für hurpin folgende Anwendungsschwerpunkte:

Diagnose:

Pathologische Vorgänge der Haut an denen hurpin beteiligt ist werden durch eine deregulierte Expression von hurpin charakterisiert sein. Entsprechend kann eine

- 30 Verlaufskontrolle und/oder eine molekulare Typisierung der verschiedenen

klinischen Erscheinungsformen einer Erkrankung durch Untersuchungen zur Expression von hurpin auf Ebene der Nukleinsäure und des Proteins erfolgen.

Diagnostische und prognostische Aussagen lassen sich auch durch den Nachweis von Mutationen des Gens für hurpin machen. Diese Mutationen können sowohl
5 eine funktionelle Veränderung regulatorischer Elemente des Gens als auch ein funktionell verändertes Protein bedingen.

Therapie:

Antisense-Therapie: Durch antisense Oligonukleotide die mit Hilfe von
10 Liposomen oder anderen geeigneten Transportern in die epidermalen Keratinozyten eingebracht werden, kann die Translation der hurpin-mRNA unterbunden werden. Hierdurch kann die pathologische Überexpression postranskriptionell korrigiert werden.

15 Inhibitor-Therapie: Eine funktionelle, postranslationelle Korrektur einer pathologischen hurpin Expression kann über die Applikation eines spezifischen, blockierenden Peptids oder Proteins erfolgen. Die Einbringung der Peptide/Proteine in die Keratinozyten würde analog zur Applikation von antisense Oligonukleoiden erfolgen.

20

Anwendungen bei der Entwicklung von Pharmaka und Kosmetika

Zur Selektion von pharmakologisch wirksamen Substanzen kann die Expression von hurpin als Testparameter Anwendung finden. Hierdurch können in der
25 Zellkultur oder im Ex-vivo Hautmodell Substanzen identifiziert werden, die eine Modulation der hurpin Expression ermöglichen.

Aufgrund der UV-Regulation von hurpin können ebenfalls photoprotektive Substanzen in den erwähnten Testmodellen auf ihre Wirksamkeit überprüft
30 werden.

Folgend wird die Erfindung durch verschiedene Versuche näher erläutert.

Methoden

5

Chemikalien, Radioisotope und Enzyme

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden die verwendeten Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen Flow Laboratories, Gibco BRL, Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

10 Die verwendeten Radiochemikalien wurden über ICN bezogen.

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Boehringer (Mannheim), Gibco BRL, New England BioLabs oder Pharmacia bezogen.

15 Zellkultur

Das epidermoide Zellline HaCaT wurde von Prof. Fusenig eingesetzt (16). Primäre Keratinozyten werden aus Hautstücken, die bei plastischen Operationen entfernt und normalerweise verworfen werden, gewonnen. Hierzu wurde die in 1 x PBS gelagerte Haut unter sterilen Bedingungen vom Fettgewebe befreit und in kleine
20 Stücke (ca. 5 mm x 5 mm) zerteilt. Die Stücke wurden 1 x PBS gewaschen und anschließend in Petrischalen 12 bis 16 Std. bei 4 °C mit der Epidermis nach oben in Dispase (Grade II, 2,4 U/ml, Boehringer Mannheim) inkubiert. Anschließend wird die Epidermis von der Lederhaut abgezogen und in 1 x PBS gewaschen. Die
25 Stücke werden für 5 bis max. 15 min. in einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,2 % Trypsin und 0,2 % EDTA in 1 x PBS gelöst) bei 37 °C inkubiert. Die Keratinozyten wurden aus dem enzymatischen zersetzten Keratingerüst mechanisch freigesetzt. Durch die Zugabe von mindestens dem dreifachen Volumen 10 %-igem FCS wurde die Trypsinisierung abgestoppt. Die pelletierten primären Keratinozyten werden in Medium (s.u.) resuspendiert und für die
30 weitere Kultivierung auf Petrischalen verteilt.

Die Zellkulturen werden in einem Inkubator bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

HaCaT-Medium: Duibecco's Mod. Eagle Medium w. Sodium Pyruvat
5 (GibcoBRL).

Hinzugefügt werden 5 ml Antibiotikum (Penicillin-/Streptomycin, 10000 µg/ml, Flow-Laboratories), 5 ml L-Glutamin (200 mM), 50 ml FCS (100 %).

Keratinocyten-Medium: KBM (Keratinocytes Basal Medium, Clonetics).

10 Hinzugefügt werden 500 µl Gentamincinsulfat (50 mg/ml), 500 µl Amphotericin (50 µg/ml), 500 µl Insulin bovine (5 mg/ml), 300 µl Epidermal growth factor (0,1 µg/ml), 500 µl Hydrocortison (0,5 mg/ml).

Jeweils 15 µl des Master-Mixes wurden zu der cDNA gegeben und mit 80 µl Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet.

Die Taq-Polymerase wird ebenfalls in Form eines Master-Mixes vorbereitet und nach der ersten Denaturierungs- und Bindungsphase (Annealing), dem Ansatz zugefügt („hotstart“).

20	Enzym-Master-Mix:	0,4 µl Taq-Enzym (5 U/µl)
		0,2 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 %)
		1,4 µl ddH ₂ O

Im Anschluß an die erste Annealing-Phase mit 41 °C verblieben die Proben bei 42 °C. Die Ölphase eines jeden Ansatzes wurde durchgestochen und 2 µl des Taq-Polymerase Master-Mixes hinzugefügt. Sobald alle Proben mit Enzym versehen sind, wird mit der ersten Elongationsphase begonnen.

DD-PCR-Programm

	Denaturierung	Primer- Bindung	hot-start	Elongation
1. Zyklus	95 °C/1min.	41 °C/1 min.	42 °C	72 °C/1 min.
2. bis 40. Zyklus	94 °C/50 sec.	42 °C + 0,1 °C/Zykl. 1 min.	-	72 °C/1 min.

Nach Beendigung aller PCR-Zyklen wurde eine 5' Elongationsphase bei 72 °C angehängt.

- 5 Ein Aliquot (5-7 µl) eines jeden Ansatzes wurde mit 1/5 5 x TBE Loading-Buffer versetzt. Die Proben wurden für 3 min. bei 75 °C denaturiert und bis zum Aufräumen auf Eis gelagert. Gleiche Probenvolumina wurden dann in einem 5 %-igen PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen bei konstant 40-45 W aufgetrennt, bis der Xylen-Xylanol-Farbmarker des Ladepuffers die untere
- 10 Gelkante erreicht hatte.
- Durch die Behandlung einer der beiden das Gel umgebenden Glasplatten mit Bindsilan haftet das Gel nach dem Auseinanderbau an der behandelten Platte. Das an der Glasplatte haftende Gel wurde mit Haushaltsfolie abgedeckt. Um die Lage des für die Autoradiographie aufgelegten Röntgenfilms exakt festzuhalten,
- 15 wurden mehrere Markierungen mittels „Tracker-Tape“ (RPN 2050, Amersham) am Rand des Geles angebracht. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte bei -70 °C ohne Verstärkerfolie.

20

Elution der cDNAs aus Polyacrylamidgelen

Differentielle Banden werden mit seitlichen Punkten auf dem Röntgenfilm markiert und der Film mit Hilfe der „Trackertape“-Markierungen in seine ursprünglichen Position auf dem Gel gebracht und dort fixiert. Mit Hilfe einer

Nadel wurde der Film an den Markierungspunkten durchstoßen und so die Position der Bande auf dem PAA-Gel gekennzeichnet. Nach Abnahme des Filmes wurde ein dünner Streifen des Geles zwischen den Einstichstellen mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten. Dieses Stück wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl ddH₂O überführt. Zur Elution der cDNA aus dem Gelfragment wurden die Proben für 20 min. auf 80 °C erhitzt und anschließend für 2 min. bei 13000 rpm (15000 g) zentrifugiert. Der gelfreie Überstand wird in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc (pH 5,2), 2,5 µl Glycogen (20 mg/ml) und 450 µl eiskalten Ethanol (100 %) wird die eluierte cDNA bei 20 °C über Nacht gefällt (optional für mind. 2 Std. in Ethanol auf Trockeneis). Die cDNAs werden bei 4 °C für 30 min. bei 13000 rpm (15000 g) pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75 % EtOH gewaschen. Das Pellet wird in TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) gelöst.

15 Reamplifizierung differentieller cDNAs

Die Reamplifizierung der eluierten cDNA-Fragmente erfolgte in einem 40 µl PCR-Ansatz mit den gleichen Primerkombinationen, die für ihre ursprüngliche Generierung bei der DD-PCR verwendet wurden.

20

25 Jeweils 4 µl der eluierten cDNA in TE werden mit:

4 µl Primer 1 (2 µM)

4 µl Primer 2 (2 µM)

3,8 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 %)

30

4 µl Gelatine (0,1 %)

3,2 µl dNTP-Mix (250 µM)

15 µl DEPG-Wasser

5 kombiniert und mit Mineralöl überschichtet. Zur Reduzierung von Pipettierungenauigkeiten wurden die Komponenten für mehrere Ansätze in Form eines Mastermixes kombiniert.

Das Taq-Enzym wurde wie bei der DD-PCR in µl 1x Taq-Polymerase-Puffer im „hot-start“-Verfahren zugegeben.

10 Um die Spezifität der Amplifizierung zu erhöhen wurde im Gegensatz zum DD-PCR Programm bei der Reamplifizierung ein „touch down“ Protokoll verwendet. Hierbei wurde in den ersten 5 Zyklen der PCR eine erhöhte Anealing-Temperatur verwendet, die pro Zyklus so verringert wird, daß ab dem 6. Zyklus die für die Primerkombination optimale Temperatur erreicht ist. Durch die anfänglich stringenteren Bedingungen ist die Amplifizierungseffektivität zwar geringer, es wird
15 aber sichergestellt, daß präferentiell das gewünschte Produkt amplifiziert wird. Nachdem so ausreichende Mengen des gewünschten Templates vorliegen, kann bei der an die Primer angepaßten Anealing-Temperatur mit hoher Effizienz amplifiziert werden. Der Erfolg dies Vorgehensweise zeigte sich im nachfolgenden präparativen Agarosegel durch kaum vorhandene unspezifische PCR-Produkte.

20

	Denaturierung	Primer-Bindung	hot-start	Elongation
1. Zyklus	95°C/1 min	50°C/1 min	50°C	72°C/2 min
2. bis 5. Zyklus	94°C/50 sec	49°C-1°C/Zykl 1 min	-	72°C/2 min
6. bis 35. Zyklus	94°C/50 sec	45°C/1 min	-	72°C/2 min + 2 sec/Zykl.

Klonierung von PCR-Produkten

Für die Ligation wurden die reamplifizierten cDNA-Fragmente nach Größenfraktionierung im Agarosegel mit JetSorb (Genomed) nach
25 Herstellerangaben aus dem Gel eluiert. Für die TA-Klonierung von PCR-

Produkten wurde der TA-Klonierungskit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Die Ligation erfolge im Vektor: cDNA-Verhältnis von 1:3.

Herstellung einer lambda-cDNA Bank

5 Zur Isolation von cDNA-Klonen voller Länge wurde mit poly(A)⁺-RNA aus HaCaT-Zellen eine cDNA-Bank in Uni-ZAP XR (Stratagene, Heidelberg) hergestellt. Die Anreicherung von poly(A) mRNA aus Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Oligotext mRNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) entsprechend der Herstellungsvorschrift durchgeführt. Für die Herstellung der cDNA-Bank aus 4
10 µg poly(A)-RNA wurde der ZAP-cDNA Klonierungskit (Stratagene, Heidelberg, Germany) nach den Vorschlägen des Herstellers mit Ausnahme folgender Modifikationen eingesetzt:

- für die Herstellung des 1. Stranges cDNA wurde Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco, BRL, Eggenstein) eingesetzt
- 15 • für die Größenfraktionierung der Xho I gespaltenen cDNA wurde eine S-400 Zentrifugationssäule verwendet.

Nach Ligation der cDNA-Fraktion mit Molekülen >500 bp in Uni-ZAP-XR Vektorarme wurde die Bank unter Verwendung des Gigapack III Gold Verpackungsextraktes (Stratagene, Heidelberg, Germany) in λ-Phagenpartikel
20 verpackt.

Die nach einmaliger Amplifizierung erhaltenen cDNA-Bank hatte einen Titer von 1.4×10^{10} pfu/ml.

Klonierung von cDNA-Klonen voller Länge

25 Für die Identifizierung von hurpin cDNA-Klonen wurden 10^6 pfu auf Hybond-N⁺ Nylonmembranen (Amersham, Braunschweig) unter Verwendung von Standardmethoden (17) übertragen. Als Sonde wurde die 412bp lange HUR7 cDNA, nach radioaktiver Markierung mit [α -³²P] dCTP unter Verwendung des Megaprimer DAN Markierungskits (Amersham, Braunschweig, Germany),
30 eingesetzt. Die Nylonmembranen wurden für 2 h bei 88 °C in QuickHyb

(Stratagene, Heidelberg, Germany) prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde dann in der gleichen Lösung über Nacht bei 68 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen unter stringenten Bedingungen (final bei 55 °C in 0.1 x SSC, 0.1 % SDS) gewaschen und positive
5 Plaques durch Autoradiographie mit Hyperfilm (Amersham) sichtbar gemacht. Durch eine zweite Filterhybridisierung mit immobilisierten Phagen jeweils eines positiven Plaques wurden individuelle Phagen identifiziert, die mit der HUR 7-cDNA hybridisierten. Die cDNA-Inserts dieser Phagen wurden durch in vivo Excision des pBlueScript SK Phagemid aus dem Phagenom nach
10 Herstellerangaben präpariert.

Restriktionsanalyse der cDNA-Klone

Die cDNA-Inserts aus den pBS-Vektoren wurden mit Eco RI (2U/µg) und Xho I herausgeschnitten. Da der pBS-Vektor eine nur unwesentlich andere Größe als sie
15 cDNA-Fragmente hatte, wurde zur besseren Identifizierung und Trennung der Fragmente zusätzlich der Vektor mit Pvu I (1,7 U/ug) geschnitten. In allen Restriktionsansätzen wurde mit Boehringer-„high-salt“-Puffer gearbeitet. Für weitere Restriktionsanalysen wurden die Plasmide mit NotI, Pst I, Xba I, Sac I und Bam HI nach Standardvorschrift (17) geschnitten und in einem 1%igen
20 Agarosegel analysiert.

Northern-Blot Analysen

10µg Gesamt-RNA aus HaCAT-Zellen wurden in einem 1%igen Formaldehyd-Agarose-Gel größenfraktioniert und mittels Kapillar-Blot-Verfahren auf Hybond
25 N⁺-Nylonmembranen (Amersham) transferiert. Northern-Blots mit poly(A)⁺-mRNA aus verschiedenen humanen Geweben (MTN: multiple tissue Northern blots) wurden von Clontech bezogen.

Für die Hybridisierung von Filtern wurden die DNA-Fragmente, die als Hybridisierungssonden eingesetzt wurden, mit [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; ICN)
30 unter Verwendung des „Megaprime labeling kit“ von Amersham markiert. Freie

Nukleotide wurden durch Chromatographie über eine S300-Zentrifugationssäule (Pharmacia) abgetrennt. Die Einbaurate von [³²P]-dCTP in die DAN wurde durch Messen eines Aliquots der Markierungsreaktion in einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die spezifische Aktivität betrug 1-2 x 10⁹ cpm/μg DAN.

Die Hybridisierung wurden in DIG-Easy-Hyb-Lösung (Boehringer Mannheim) über Nacht durchgeführt. Nach stringentem Waschen der Membranen (final 55-60°C, 0.1% SDS, 0.1 x SSC) wurden Signale durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham) mit Verstärkerfolie bei -70°C sichtbar gemacht.

RT-PCR Analysen

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde eine rekombinante Mo-MLV Reverse-Transkriptase ohne Rnase-H Aktivität (Superscript II, Gibco BRL) mit dem mitgelieferten 5xPuffersystem [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM, KCl, 15 mM MgCl₂] eingesetzt. Je Ansatz wurde 1 μg Gesamt-RNA in ddH₂O und 10 pmol dT₁₂₋₁₈-Primer (Pharmacia) eingesetzt (Gesamt-Vol.: 11 μl). Nach Hitzedenaturierung (10' bei 70 °C) der RNA und Abkühlen auf Eis wurden zugegeben:

4 μl 5 x Puffer
2 μl 0.1 M DTT
1 μl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
1 μl Rnasin (40 U, Promega)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl (200 U) Reverse-Transkriptase (RT) gestartet und lief bei 42 °C für 1 h. Inaktivierung der RT erfolgte durch 5 minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 70 °C. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert. Für den Nachweis spezifischer Transkripte wurde mit Hilfe von zwei spezifischen Primern das entsprechende cDNA-Fragment in der PCR amplifiziert. Die Sequenz der verwendeten Primer wurde mit Hilfe des Computerprogramms „Oligo“, Version 3.3 optimiert (Kontrolle der Duplex-

Bildung Homologie der 3' und 5' Enden zueinander, Selbstkomplementarität, Schmelztemperatur des Primers). Um die Reaktionsbedingungen in der PCR zu optimieren, wurden mit jedem Primer-Paar und einer Positivkontrolle mehrere Test-PCR-Analysen durchgeführt, in denen die $MgCl_2$ -Konzentration (1,5-2,5 mM) und die Temperatur (Variation der mit „Oligo“ ermittelten Temperatur) während des Primer-Bindungsschrittes („annealing“) variiert wurden.

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes:

- 10 4,7 μ l 10xTaq-Puffer [100 mM Tris-HCl (pH8.3 bei 25 °C), 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$]
 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dTTP)
 0,5 μ l Primer 1 (10 μ M/ μ l)
 0,5 μ l Primer 2 (10 μ M/ μ l)
 15 x μ l 60 mM $MgCl_2$ (je nach Primer, um Endkonzentration von 2,0 mM oder 2,5 mM zu erreichen)
 47 μ l ddH₂O

Auflistung der bei RT-PCR-Analysen verwendeten Primer

Gen/Primer		Sequenz (5'-3')	Hybridisierungs-Temp. [°C]	$MgCl_2$ [mM]
hurpin 1	5'	TAAAGGGCAATGGGACAGGGAGT	58	1,5
hurpin 2	3'	GCGGATGTGACAGTAAAGCCTATG		
β -Aktin-1	5'	CGGGAAATCGTGCGTGACATTA	63	2,0
β -Aktin-2	3'	GTTGGCGTACTGGTCTTTGCGGAT		

		ACATTA	
β-Aktin-2	3'	GTTGGCGTA	63
		CTGGTCTTT	2,0
		GCGGAT	

Die Verdunstung während der Inkubation wurde durch Überschichten des Reaktionsansatzes mit Mineralöl verhindert. Um das Entstehen unspezifischer Produkte einzuschränken, wurde ein „hot-start“ durchgeführt, bei dem 2 U Taq-Polymerase in 3 µl 1 x Taq-Puffer zum Reaktionsansatz nach dem ersten Denaturierungsschritt der PCR zugegeben wurde.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler der Fa. Biometra (Trioblock).

10 Standard-PCR-Programm: 94 °C 1 min.
 50-88 °C 1 min. (Primer spezifisch)
 72 °C 2 min.
 Wiederholung für 25-30 Zyklen
 72 °C 5 min.

15

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte in 1,5 %-igen Agarosegelen. Die DNA-Fragmente wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und unter langwelligem UV-Licht für die Dokumentation sichtbar gemacht.

20 Methoden

Chemikalien, Radioisotope und Enzyme

Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurden die verwendeten Chemikalien in p.A. Qualität von den Firmen Flow Laboratories, Gibco BRL, Merck, Roth, Serva oder
25 Sigma bezogen. Die verwendeten Radiochemikalien wurden über Amersham ([³⁵S]-Methionin, labeling grade) bezogen. Restriktionsendonukleasen und andere

Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Boehringer (Mannheim), Gibco BRL, New England BioLabs oder Pharmacia bezogen.

Nicht-radioaktive in situ-Hybridisierung

5

Mit Hilfe der in situ-Hybridisierung ist es möglich, Analysen von Nukleinsäuren auf Einzelzellebene durchzuführen. Zum Nachweis spezifischer mRNAs in Zellen wurden Digoxigenin-markierte RNA-Sonden eingesetzt. Die Hybridisierung wurde durch Umsetzung eines Farbstoffgemisches (NBT/BCIP) mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (AP) nachgewiesen, die mit einem Anti-Dig Fab-Fragment konjugiert war.

10

Die in situ-Hybridisierung umfaßt mehrere Teilschritte, die im folgenden erläutert werden.

15 In vitro-Transkription

Digoxigenin-markierte RNA-Sonden wurden mittels des Dig RNA labeling Kit (SP6/T7) von Boehringer Mannheim hergestellt.

Um eine möglichst Hurpin-spezifische Sonde herzustellen, wurde ein in anderen Serpinen nicht konservierter Teil aus dem 3'-nicht translatierten Bereich der Hurpin-Sequenz ausgewählt. Mit Hilfe der PCR wurde die entsprechende cDNA unter Verwendung des Plasmid pBS-HP1.1 generiert. Um mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase unter Verwendung dieser amplifizierten cDNA eine RNA-Sonde herstellen zu können, wurde am 5' der entsprechenden Hurpin-spezifischen Primer eine T7-Promotorsequenz angehängt. Die T7-RNA-Polymerase bindet an diese T7-Promotorsequenz und katalysiert die Transkription der mRNA-Sonde. Die Sonde wird dabei durch den Einbau von digoxigeniertem dUTP (Dig-dUTP) markiert.

25

Hurpin-spezifische Primer:

30

HPLF1 (5'-Primer):

TGCATCGCCACAATCCAGTTTTAG

5 HPLF2 (3'-Primer):

CCAGCAATTTCTAGCCTAGGGAATCT

Hurpin-spezifische Primer mit T7-Promotorsequenz:

HPFL1-T7 (5'-Primer):

10 ACTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGTGCATCGCCACAATCCAGTTT
TAG

HPLF2-T7 (3'-Primer):

ACTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGCCAGCAATTTCTAGCCTAGGG
AATCT

15

Für die PCR-Amplifizierung der cDNA-Matrize zur Generierung der „anti-sense“-Sonde wurde die Primerkombination HPLF1/HPLF2-T7, zur Generierung der „sense“-Sonde wurde die Primerkombination HPLF1-T7/HPLF2 eingesetzt. Die generierten PCR-Produkte hatten eine Größe von 462 bp.

20 Die PCR wurde, wie unter RT-PCR beschrieben, durchgeführt. Anstelle der cDNA wurde als Template 0,2 ng des Hurpin-Plasmides pBS-HP 12.2 eingesetzt.

PCR-Bedingungen:

1. Zyklus

25 1 min. Denaturierung bei 95 °C

1 min. Primer-Bindung bei 58 °C

1 min. Polymerisation bei 72 °C

2.-35. Zyklus

30 55 sec. Denaturierung bei 95 °C

50 sec. Primer-Bindung bei 58 °C

1 min. Polymerisation bei 72 °C

Abschließend 5 min. Inkubation bei 72 °C

5

Vor dem Einsatz in der in vitro-Transkription wurden PCR-Produkte (cDNA-Matrize) über ein Agarosegel aufgereinigt.

Herstellung der RNA-Sonden

- 10 Für die in vitro-Transkription wurden 1 µg cDNA-Matrize zusammen mit 2 µl NTP Labeling-Mixtur, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer und 1 µl RNase- Inhibitor in ein RNase-freies Gefäß gegeben und mit DEPC behandeltem Wasser auf 18 µl aufgefüllt. Nach Zugabe der T7-RNA-Polymerase wurde der Ansatz 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Synthese wurde die DNA-Matrize durch DNase abgebaut. Die
- 15 Reaktion wurde durch 2 µl einer 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt.

Reinigung der RNA-Sonde

- Es ist stets notwendig, die nicht eingebauten Nukleotide aus der Lösung der synthetisierten RNA-Sonden zu entfernen, da diese zu unspezifischen Signalen
- 20 führen. Hierzu wurden 24 µl des Probenansatzes mit 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eiskaltem EtOH (100 % (v/v)) gemischt und die RNA durch Inkubation bei -70°C für 30' präzipitiert. Durch Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g wurde die RNA pelletiert, während die Nukleotide im Überstand verblieben. Nach Waschen des Pellets in 50 µl 75 % (v/v) EtOH nachfolgender Zentrifugation (12000g) und
- 25 anschließendem Trocknen, wurde die RNA in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser resolubilisiert. Die Lagerung der mRNA-Sonde erfolgte bei -70 °C

Quantifizierung der RNA-Sonde

Durch Vergleich einer RNA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration mit einer Verdünnungsreihe der synthetisierten Sonde wurde die Konzentration der Sonde bestimmt. Dazu wurde durch Verdünnung einer mitgelieferten Kontroll-RNA eine

5 Eichreihe hergestellt. Je 1 µl der verdünnten Lösungen wurden auf eine Nylonmembran gedotet. Die synthetisierte Sonde wurde in gleicher Weise verdünnt und ebenfalls auf die Membran gedotet. Durch Backen der Membran wurden die Nukleinsäuren immobilisiert. Danach wurde die Membran kurz in Waschpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0,3 % (v/v) Tween 20, pH

10 7,5) gewaschen und anschließend 30 min. bei RT in 1 % Blocking-Lösung (Boehringer-Mannheim) in Maleinsäure-Puffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) inkubiert. Nach Blockierung freier Bindungsstellen der Membran wurde diese 30 min. in der anti-Dig-Fab-AP-Konjugat-Lösung inkubiert. Das anti-Dig-Fab-AP-Konjugat (Boehringer-Mannheim) wurde in 1 % Blocking-

15 Lösung 5000-fach verdünnt.

Das anti-Dig-Fab-AP-Konjugat bindet spezifisch an die digoxigenierten Nukleotide. Die Membran wurde anschließend zweimal 15 min. mit Waschpuffer gewaschen und dann 2 min. in alkalischen Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl,

20 100 mM NaCl, pH 9,5) gegeben, wodurch das Enzym aktiviert wurde. Die Membran wurde daraufhin in ein Farbstoffsubstrat-Gemisch überführt. Dieses Gemisch bestand aus 45 µl NBT- und 35 µl BCIP-Lösung, die in 10 ml Detektionspuffer aufgenommen worden waren. Die Farbreaktion fand im Dunkeln für 30 min. bis max. 16 h statt und wurde durch Spülen der Membran in TE-

25 Puffer gestoppt. Durch Vergleich der Farbintensität der einzelnen Punkte wurde die Konzentration der Sonden bestimmt.

Die Sonden wurden mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt und als 10 µl Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

30 Reinheitsskontrolle der Sonde

Zur Kontrolle des Transkripts wurden nach der Quantifizierung je Ansatz 75 ng der RNA-Sonde auf einem denaturierenden 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt. Die aufgetrennten Transkripte wurden anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Nach Backen der Membran wurde wie bei der Quantifizierung der synthetisierten Sonde verfahren. Der Umsatz des Substratgemisches zeigt an, ob
5 die Sonde richtig quantifiziert und ob das richtige Transkript synthetisiert wurde.

11.2 In situHybridisierung

10 Gefrierschritte von Hautbiopsien

Hautbiopsien wurden nach der Entnahme in Einbettmedium (Eukitt) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger übertragen.

15

Fixierung der Gefrierschnitte

Die Objektträger wurden auf RT erwärmt und die Gewebeschnitte mit einem Föhn (Kaltluftstufe) getrocknet. Fixierung erfolgte durch 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) für 4 h bei 4 °C.

20

Hybridisierung

Die Objektträger wurden in einer Riesenküvette für 5 min. in DEPC-1x PBS mit 0,02 % (v/v) Triton X-100 bei RT geschüttelt. Durch das Detergenz wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Das Waschen mit DEPC-1x PBS für 10 min.
25 entfernte das Detergenz. Die Vorhybridisierung erfolgte mit Dig-Easy Hyb (Boehringer) bei 46 °C in einem Hybridisierungssofen für mind. 1h. Anschließend wurde Prähybridisierungslösung gegen 100 µl Hybridisierungslösung mit der denaturierten RNA-Sonde (300 pg/µl) ausgetauscht.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 46 °C.

30

Waschschritte

Nach erfolgter Hybridisierungsreaktion folgten mehrere Waschschritte, in denen ungebundene und unspezifisch gebundene Sonden entfernt wurden. Alle Waschschritte fanden unter sanftem Schütteln in einer Riesenküvette statt.

5

-1x PBS mit 0,02 % (v/v) Triton X-100	RT	5 min.
-2x SSC	RT	10 min.
-1x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS	50 °C	2x10 min.
-0,5x SSC mit 0,1 % (w/v) SDS	RT	10 min.
10 -0,2x SSC	RT	10 min.
-0,1x SSC	RT	10 min.
-1x PBS	RT	5 min.
-Puffer 1	RT	5 min.
(100mM Tris-HCl, 159 mM NaCl, pH 7,5)		

15

Detektion der Hybride

Um unspezifische Bindungen des anti-Dig-Fab-AG-Konjugats zu verhindern, wurden die Schnitte mit 100 µl Abdeckpuffer (Puffer 1, 0,2 % (w/v) BSA, 0,3 % (v/v) Triton X-100) bei RT 30 min. inkubiert. Die folgende Inkubation mit 100 µl

20 Anti-Dig-Fab-AG-Konjugatlösung fand 2 h bei RT statt. Der Anti-Dig-Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist, (Boehringer Mannheim) wurde in Dilutionspuffer (Puffer 1, 0,01 % (w/v) BSA, 0,02 % (v/v) Triton X-100) 1000fach verdünnt. Durch zweimaliges Waschen in Puffer 1 für je 10 min. wurde ungebundenes Anti-Dig-Fab-AG-Konjugat entfernt. Mit Puffer 3

25 (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5), der für 5 min. bei RT einwirkte, wurde ein alkalisches Milieu erzeugt, in dem die alkalische Phosphatase aktiviert wird. Die Farbreaktion wurde durch Gabe von 100 µl Farbstofflösung je Kammer initiiert. Die Farbstofflösung bestand aus 22,5 µl NBT und 17,5 µl CIP in 5 ml Puffer 3. Die Reaktion wurde im Dunkeln durchgeführt,

30 mikroskopisch kontrolliert und dauerte zwischen 30 min. und 16 h. Nach

entsprechender Färbung wurde die Reaktion durch TE-Puffer gestoppt. Die Präparate wurden eingebettet und die in situHybridisierung fotografisch dokumentiert.

5 Subklonierung der Hurpin kodierenden Sequenz

Mit Hilfe der PCR unter Verwendung spezifischer Primer, die benachbart zur codierenden Sequenz für Hurpin liegen, wurde ein 1192 bp langes Fragment aus dem Klon 1.1 generiert.

Um die Fehlerrate in den generierten PCR-Produkten möglichst gering zu halten, wurde für die Amplifizierung das Expand High Fidelity PCR System von Boehringer Mannheim eingesetzt.

Jeweils 0,4 ng Plasmid wurden mit 2,6 U Enzym, in einem nach Herstellerangaben zusammengesetzten 100 µl PCR-Ansatz mit 2,0 mM MgCl₂ und je 30 pmol Primer HPPE1 und HPPE2 amplifiziert.

15

Verwendete Primer:

HPPE1 (5') CAGAATTCATGGATTCACTTGGCGCCGTCAGC

HPPE2 (3') ACGAATTCTTAAGGAGAAGAAAATCTGCCG AAGAAGAG

20 GATGCT

Die Hurpin-spezifische Sequenz der Primer wurde am 5'-Ende durch eine Restriktionsschnittstelle für EcoRI sowie um 2 irrelevante Nukleotide („clamp“) verlängert.

25

PCR-Bedingungen:

1. Zyklus

5 min. Denaturierung bei 95 °C

1 min. Primer-Bindung bei 68 °C

30 2 min. Polymerisation bei 72 °C

2.-30. Zyklus

55 sec. Denaturierung bei 95 °C

1 min. Primer-Bindung bei 68 °C

5 2 min. Polymerisation bei 72 °C mit Zeit-Inkrement von 2 sec/Zyklus

Abschließend 5 min. Inkubation bei 72 °C.

Das amplifizierte Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt und über TA-
10 Klonierung in einen geeigneten pGEM-Vektor (Promega) kloniert.

Durch Sequenzanalyse wurde die Fehlerfreiheit der Hurpin-Sequenz und die Orientierung des cDNA-Fragmentes bezüglich des T7-Promotors des Vektors überprüft.

Ein rekombinanter pGEM-Vektor, der das 5'-Ende der Hurpin-codierenden
15 Sequenz benachbart zum T7-Promotor des Vektors enthielt, wurde für die gekoppelte in vitro Transkription/Translation ausgewählt.

Gekoppelte in vitro Transkription/Translation

Für die gekoppelte in vitro Transkription/Translation wurde ein Retikulozyten-
20 Lysat-System und eine T7 RNA Polymerase der Firma Promega eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurden in einem 50 µl Ansatz 1-2 µg Plasmid-DANN als Matrize eingesetzt. Die Markierung des in vitrotranslatierten Proteins erfolgte durch den Einbau von [³⁵S]-Methionin. Zur Expression des Hurpin codierenden cDNA-Inserts wurde der Ansatz für 90 min. bei 30 °C inkubiert.

25 Die Lagerung des so hergestellten [³⁵S]-Hurpins erfolgte bei -80°C.

Hurpin-Proteinase Interaktionen

Gereinigte humane neutrophilen Elastase (HNE), Cathepsine (cat) B,D,G,L, Chymotrypsin (CT), Trypsin, Plasmin, Proteinase 3 (PR3) wurden über Athens
30 Research & Technology, Inc. (Athens, GA) bezogen. Humanes Thrombin wurde

von Sigma bezogen. PBS Reaktionspuffer (0,01 M phosphate buffer, 27 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4) wurde für catG, Plasmin, Thrombin und HNE verwendet. Cathepsin-Reaktionspuffer (50 mM sodium acetate, pH 5,5, 4 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA) wurde für catL, catB und catD eingesetzt. CT und Trypsin wurden
5 in 0,2 M Tris-HCl, pH 7,8, 20 mM CaCl₂ und PR3 in 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 6,7 eingesetzt.

100 µl der in vitro Translationsreaktion wurden mit Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) auf ein Volumen von 500 µl gebracht. Das in vitrotranslatierte [³⁵S]-Hurpin wurde anschließend durch aufeinanderfolgende Ultrafiltration über Microcon 100 und
10 Microcon 30 Einheiten von Amicon (Millipore, Eschborn, Germany) größenfraktioniert. Das [³⁵S]-Hurpin enthaltende Retentat wurde mit Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) auf ein Volumen von 148 µl aufgefüllt. Die Quantifizierung des in vitrotranslatierten [³⁵S]-Hurpin über die Menge des eingebauten [³⁵S]-Methionins ergab eine Hurpinkonzentration von 47,75 ng/µl. 191 ng dieses [³⁵S]-Hurpin
15 (Endkonzentration 0,542 µM) wurden in dem geeigneten (s.o.) Puffer mit verschiedenen Proteasen (Endkonzentration 0,025 µM und 0,5 µM) für 15 min. bei 25 °C und 15 min. bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 8 µl inkubiert.

SDS-PAGE Analyse

20 Proteine wurden mit 2x Ladepuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % Glycerol, 4 % SDS, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,01 % Bromphenol-Blau) versetzt und auf 100 °C für 4 min. erhitzt. Die Größenfraktionierung wurde in einem 10 % ProSieve 50 Gel (FMC, USA, ME) entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung eines Tris/Tricine Elektroden Puffersystems durchgeführt. Das [³⁵S]-Hurpin
25 wurde durch Autoradiographie mit Hyperfilm (Amersham, Braunschweig, Germany) nachgewiesen.

Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele und Abbildungen im Detail erläutert:

Beispiele

Beispiel 1

5 1. Differential Display (DD-PCR) Analysen

HaCaT-Zellen wurden mit einer subletalen UVB-Dosis (100 J/m^2) bestrahlt und 0.5, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h und 24 h später geerntet. Für die DD-PCR Analysen wurde die RNA aus Zellen 8 h und 24 h nach UVB-Bestrahlung und aus unbestrahlten Zellen zu Beginn des Experiments sowie nach 24 h in Kultur verwendet. Die
10 parallele Analyse dieser 4 Zellpopulationen macht es möglich, Banden auszuschließen, die zufällig zwischen den verschiedenen Spuren des Displays variieren und reduziert somit die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Banden für die folgenden Analysen auszuwählen. Weiterhin kann durch diese parallele Analyse das Potential der DD-PCR zur Erfassung von quantitativen
15 Unterschieden als zusätzliches Kriterium bei der Identifizierung von UVB-abhängig regulierten Sequenzen eingesetzt werden.

In Abb. 1 ist ein Teil einer solchen „differential display“ (DD Analyse dargestellt. Unabhängige DD-PCR-Analysen zeigten, daß mit dem erarbeiteten Protokoll für eine bestimmte Primer-Kombination ein bestimmtes Bandenmuster
20 reproduzierbar hergestellt werden konnte. Das komplexe Bandenmuster zeigt, daß die UVB-Bestrahlung sowohl zu einer Induktion als auch einer Repression verschiedener Gene innerhalb von 24 h nach Bestrahlung führt.

Für hurpin konnte bei dieser Analyse eine differentiell nach UVB-Bestrahlung regulierte cDNA-Bande von 412 bp dargestellt werden. Da die UVB-Bestrahlung
25 einen reprimierenden Effekt auf die Transkriptmenge des korrespondierenden Gens hatte, wurde als Bezeichnung für diese cDNA HUR 7, für HaCaT UV reprssed, gewählt.

Beispiel 2

2. Isolation von hurpin cDNA-Klonen voller Länge

Mit Hilfe der HUR 7 cDNA wurden im folgenden hurpin cDNA-Klone voller Länge aus einer HaCaT cDNA-Bank isoliert. Nach Hybridisieren der radioaktiv markierten HUR 7 cDNA gegen 10^5 λ -cDNA-Klone zeigten 67 Klone ein positives Signal. Von diesen wurden 20 für eine zweite Hybridisierung ausgewählt. Von den 15 positiven Klonen aus diesem zweiten Screening wurden 12 für die in vivo Excision des Insert tragenden pBlueScript SK Phagemid aus dem Phagengenom ausgewählt. Eine Restriktionsanalyse der erhaltenen Phagemide zeigte, daß 3 Klone nicht mit HUR 7 und den übrigen Phagemiden korrespondierten. Die 9 verbleibenden Klone konnten aufgrund ihrer Größe und ihres Restriktionsmusters in 3 Gruppen eingeteilt werden.

Beispiel 3

3. Sequenzanalyse der hurpin cDNA-Klone

Jeweils ein repräsentativer Klon der 3 Phagemidgruppen wurde vollständig sequenziert. Eine Zusammenfassung der Eigenschaften dieser Klone ist in Abb. 2 dargestellt. Der Klon 1.1 mit einem 3130 bp großem cDNA-Insert repräsentiert das 3.4 kb Transkript, während Klon 12.2 mit einem 2637 bp großem cDNA-Insert das kleinere 3.0 kb Transkript repräsentiert. Der Klon 16.1 korrespondiert ebenfalls mit dem 3.0 kb Transkript, enthält aber eine 188 bp große Insertion, die in den übrigen Klonen fehlt. Da diese Insertion den offenen Leserahmen unterbricht, handelt es sich nicht um eine alternativ gespleißte RNA-Variante. Obwohl keine perfekte Splice-Konsensus-Sequenz gefunden werden konnte, repräsentiert die Insertion damit vermutlich ein ungespleißtes Intron.

Die vergleichende Analyse der Sequenz der verschiedenen Klone zeigte, daß die in Northern-Blot beobachteten distinkten zwei Transkripte auf die Verwendung von unterschiedlichen Polyadenylierungssignalen zurückzuführen ist.

Das 3.0 kb große Transkript wird durch die Verwendung eines Konsensuspolyadenylierungssignals AAUAAA 13 nt oberhalb des poly(A)-

Schwanzes generiert. In der 3'untranslatierten Region (3'UTR) des 3.4 kb Transkriptes finden sich zwei funktionelle Varianten des Konsenssignals mit der Sequenz AAUAAU und AAUAUA, die sich 56 nt bzw. 22 nt oberhalb des poly(A)-Schwanzes befinden.

5

Alle cDNA-Klone enthalten einen einzelnen offenen Leserahmen (ORF) mit einer Länge von 1178 bp beginnend von Position 103 der Sequenz des Klons 1.1 mit einem ATG in einer Kozak Konsensussequenz. Klon 1.1 enthält mit 102 bp den längsten 5' untranslatierten Bereich (5'UTR).

10 Das putative Protein besteht aus 391 Aminosäuren und hat eine berechnete molekulare Masse von etwa 44 kDa und einen pI von 5.47.

Datenbanksuche gegen die EMBL-Sequenz-Datenbank zeigte, daß das durch die cDNA-Klone kodierte Protein neu ist, aber deutliche Homologien zu Mitgliedern des Ovalbumin-Zweiges der Serpin-Superfamilie von Proteaseinhibitoren hat
15 (Tabelle 1). Die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz fand sich zwischen hurpin und den „squamous cell carcinoma antigen“ (SCCA) 1 (59,1 %), SCCA 2 (58,5 %) und bomapin/PII0 (43,5 %). Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab, daß hurpin ein typisches Serpin darstellt, bei dem 46 der für Serpine als charakteristisch beschriebenen 51 Aminosäuren (5) konserviert
20 sind (Abb. 3).

Zusätzlich zu den Übereinstimmungen auf Aminosäureebene besitzt hurpin alle strukturellen Merkmale, die die Ovalbumin-Serpine von den übrigen Mitgliedern der Serpin-Superfamilie trennen:

- hurpin besitzt keine N-terminale Verlängerung und der ORF beginnt mit der
25 Aminosäure 23 von α -1-Antitrypsin (α -1-PI)
- hurpin besitzt keine c-terminale Verlängerung und endet mit Pro³⁹¹, korrespondierend zu Pro³⁹¹ in α -1-PI.
- die vorletzte Aminosäure ist Ser und nicht Asp, wie bei den übrigen Mitgliedern der Superfamilie

- hurpin besitzt eine variable Aminosäure anstelle von Valin in Position 388 bezüglich α -1-Pi
- hurpin besitzt kein typisches N-terminales hydrophobes Signalpeptid.

5 Durch Vergleich mit anderen Ovalbumin-Serpinen konnten die Spezifität bestimmenden Positionen P₁-P₁ des potentiellen reaktiven Zentrums als Thr³⁵⁶-Ser³⁵⁷ identifiziert werden. Die große Identität der „hinge“-Region von hurpin mit der postulierten Konsensussequenz der inhibitorischen Serpine (18,19), läßt eine Protease inhibierende Aktivität für hurpin vermuten (Abb. 3).

10

Beispiel 4

4. Northern-Blot Analysen

Bei Verwendung der cDNA-Inserts der volle Länge cDNA-Klone für HUR 7 als radioaktive Sonde im Northern-Blot mit HaCaT-Zellen Gesamt-RNA konnte das
15 gleiche Hybridisierungsmuster wie mit dem ursprünglichen „differential display“ Klon (HUR 7) generiert werden. Die detektierten zwei Transkripte von ca. 3.0 und 3.4 kb zeigten die gleiche Abnahme der steady-state mRNA-Menge nach UVB-Bestrahlung mit 100 J/m² wie nach Hybridisierung mit dem ursprünglichen HUR 7 Fragment. Ebenso wie mit dem ursprünglichen HUR 7 cDNA-Klon konnte auch
20 mit den cDNA-Klonen voller Länge in anderen humanen Geweben (MTN-Northern-Blots: Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Sklettmuskel, Pankreas) kein Signal detektiert werden.

Beispiel 5

25 5. RT-PCR Analyse

Bei RT-PCR Analysen mit spezifischen Primern für hurpin konnte eine Expression nicht nur in HaCaT-Zellen, sondern auch in kultivierten primären Keratinozyten und in Biopsiematerial aus gesunder Haut nachgewiesen werden. Kultivierte menschliche retinale Pigmentepithelzellen sowie Iris-Epithelzellen
30 zeigten dagegen keine hurpin Expression. Die geringere Expression von hurpin in

normaler Haut im Vergleich mit der Expression in HaCaT-Zellen oder kultivierten primären Keratinozyten ließ eine Assoziation von hurpin mit dem Proliferationszustand von Keratinozyten vermuten. Ein charakteristisches Merkmal der psoriatischen Haut ist die Hyperproliferation der Keratinozyten. Um die Assoziation von hurpin mit der Proliferation von Keratinozyten zu überprüfen, wurde die Expression von hurpin in befallener und unbefallener Haut von 2 psoriatischen Patienten mittels RT-PCR untersucht. Die befallene Haut zeigte dabei eine bis zu 10-14 fach stärkere Expression von hurpin im Vergleich mit der unbefallenen Haut desselben Patienten.

10

Zur Untersuchung der möglichen Interaktion des neuen Inhibitors mit bekannten Proteasen, wurde das Hurpin-Protein durch eine gekoppelte in vitro Transkription/Translation hergestellt. Das mit [³⁵S]-markierte Protein wurde dann mit verschiedenen Serin- und Cystein-Proteasen und einer Aspartase inkubiert.

15

Beispiel 6

1. In situHybridisierung

Die in situHybridisierung von Gefrierschnitten psoriatischer und normaler Haut bestätigte die bereits in den RT-PCR Analysen gemachten Beobachtung einer deutlichen Überexpression von Hurpin in psoriatischer Haut im Vergleich zur Expression in normaler Haut (Abb. 10).

20

Über diese Bestätigung der Psoriasis-assoziierten Expression hinaus, konnte durch die in situHybridisierung zudem die Verteilung der Hurpin exprimierenden Zellen in der mehrschichtigen Epidermis demonstriert werden. Mit Ausnahme weniger Zellschichten direkt unterhalb der Hornschicht, zeigen alle Schichten der psoriatischen Epidermis Keratinozyten mit einer starken Hurpin-Expression. In der normalen Haut ist die Expression von Hurpin nicht nur generell schwächer, sondern beschränkt sich nahezu ausschließlich auf die basalen und subprabasalen Keratinozyten.

25

Da sich die psoriatische Epidermis durch eine erhöhte mitotische Aktivität auszeichnet, während in der normalen Haut die Proliferation auf die basalen Zellschichten beschränkt ist, unterstützt die gefundene Verteilung der Hurpin-Expression die Vermutung einer Proliferations-assoziierten Funktion von Hurpin.

- 5 Die normale Differenzierung der Keratinozyten von der Basalschicht bis zum Stratum Corneum wird auch als spezielle Form der Apoptose diskutiert. Das klinische Bild der Psoriasis kann demnach neben einer gesteigerten Proliferation der Keratinozyten auch durch eine Blockierung der Differenzierungs-assoziierten Apoptose erklärt werden. Die Verteilung der Hurpin-Expression ist daher
10 ebenfalls mit einer anti-apoptotischen Funktion dieses neuen Inhibitors in Einklang zu bringen.

Beispiel 7

Analyse der Interaktion des in vitrotranslatierten Hurpin-Proteins

- 15 Die Aminosäuresequenz des reaktiven Zentrums von Hurpin läßt eine inhibitorische Kapazität dieses neuen Inhibitors vermuten. Die Aminosäuren in der die Spezifität maßgeblich bestimmenden P1-P1' Position Thr-Ser finden sich jedoch in keinem anderen bekannten inhibitorischen Serpin. Damit läßt sich für Hurpin keine potentielle Zielprotease von der Spezifität bekannter Inhibitoren
20 ableiten.

- Charakteristisch für die Inhibition von Proteasen durch Serpine ist die Formierung eines SDS-stabilen Komplexes aus der Protease und dem im reaktiven Zentrum geschnittenen Serpin. Neben diesem Inhibitionsmechanismus kann die Interaktion eines Serpins mit einer Zielprotease auch über einen reinen Substratmechanismus
25 ablaufen. Hierbei bildet sich ebenfalls ein Komplex aus Protease und Serpin. Eine Inhibition findet jedoch nicht statt, da dieser Komplex sehr schnell in die freie Protease und das im reaktiven Zentrum geschnittene und damit inaktive Serpin zerfällt.

- Um die Reaktion von Hurpin mit bekannten Proteasen zu untersuchen, wurde das
30 in vitrotranslatierte und damit [³⁵S]-markierte Hurpin mit verschiedenen Serin-

(Trypsin, CT, HNE, Plasmin, PR3, catG, Thrombin) und Cystein-Proteasen (catB, catL) sowie einer Aspartase (catD) jeweils in einem Inhibitor/Proteaseverhältnis von 21.6:1, 4.32:1, 1.08:1 inkubiert. Die Analyse erfolgte dann durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Autoradiographie zur Detektion des radioaktiv markierten Inhibitors.

Die Auswertung der Autoradiographie zeigte für das Haupttranslationsprodukt die erwartete Größe von ca. 44 kDa. Nach Inkubation mit den verschiedenen Proteasen konnte in keinem Fall ein Serpin-typischer Komplex aus Protease und diesem 44 kDa Hurpin-Protein nachgewiesen werden (Abb. 11).

Während Hurpin unter den verwendeten Reaktionsbedingungen keine Interaktion mit catD, catG und Thrombin (mit und ohne Heparin) zeigte, wurde der Inhibitor unterschiedlich stark durch die übrigen Proteasen abgebaut. Inkubation mit PR3 führte zu einer sehr schnellen und vollständigen Degradation des Hurpin-Proteins zu nicht mehr darstellbaren niedermolekularen Fragmenten (Abb. 11, Spuren 12-14). Plasmin und Trypsin zeigten eine konzentrationsabhängige Degradation mit einem hochmolekularen Zwischenprodukt (Abb. 11, Spuren 3-5 und 18-20). Inkubation mit CT, HNE, catB und catL führten zu einem freien, gespaltenen Inhibitor (Abb. 11, Spuren 7, 10, 27, 30). Während steigende Konzentrationen von CT und HNE zu einer weiteren Degradation dieses Polypeptidfragmentes führten (Abb. 11, Spuren 6-11), zeigte es sich resistent gegen weitere Proteolyse durch catB und catL (Abb. 11, Spuren 26-31).

Die limitierte Degradation von Hurpin durch die Cysteinproteasen catB und catL ist vergleichbar mit der Modifikation des viral codierten Serpins „cytokine response modifiers A“ (crmA) bei der klassenübergreifenden Inhibition von apoptotisch relevanten Caspasen. Diese Analogie läßt für Hurpin eine mögliche Inhibition von Cystein-Proteasen vermuten.

Literatur

1. Kartasova, T., M. Ponec, and P. van de Putte. 1988. Induction of proteins and mTNAs after uv irradiation of human epidermal keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 5 174:421.
2. Kartasova, T., B. J. Cornelissen, P. Belt, and P. van de Putte. 1987. Effects of UV, 4-NQO and TPA on gene expression in cultured human epidermal keratocytes. *Nucleic. Acids. Res.* 15:5945.
- 10 3. Rosen, C. F., R. Poon, and D. J. Drucker. 1995. UVB radation-activate genes induced by transcriptional and posttranscription mechanism in rat keratinocytes. *Am. J. Phisiol.* 268:C846.
- 15 4. Liang, P. and A. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [see comments]. *Science* 257:967.
- 20 5. Huber, R. and R. W. Carrell. 1989. Implications of the three-dimensional structure of aloha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 28:8951.
6. Wright, H. T. and J. N. Scarsdale. 1995. Structural basis for serpin inhibitor activity. *Proteins* 22:210.
- 25 7. Remold-O'Donnell, E. 1993. the ovalbumin family of serpin proteins. *FEBS Lett.* 315:105.

8. Potempa, J., E. Korzus, and J. Travis. 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 269:15957.
- 5 9. Padrines, M., M. Wolf, A. Walz, and M. Baggiolini. 1994. Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3. *FEBS Lett.* 352:231.
- 10 10. Martin, S. J., G. P. Amarante-Mendes, L. Shi, T. H. Chuang, C. A. Casiano, G. A. O'Brien, P. Fitzgerald, E. M. Tan, G. M. Bokoch, A. H. Greenberg, and D. R. Green. 1996. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/SED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J.* 15:2407.
- 15 11. Quan, L. T., A. Caputo, R. C. Bleackley, D. J. Pickup, and G.S. Salvesen. 1995. Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J. Biol. Chem.* 270:10377.
- 20 12. Srinivasula, S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, and E. S. Alnemri. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:14486.
- 25 13. Susin, S. A., N. Zamzami, M. Castedo, E. Daugas, H. G. Wang, S. Geley, F. Fassy, J. C. Reed, and G. Kroemer. 1997. The Central Executioner of Apoptosis: Multiple Connections between Protease Activation and Mitochondria in Fas/APO-1/CD95-and Ceramide- induced Apoptosis. *J. Exp. Med.* 186:25.

14. Staiano Coico, L. K. Carano, V. M. Allan, M. G. Steiner, I. Pagan Charry, B. B. Bailey, P. Babaar, B. Rigas, and P. J. Higgins. 1996. PAI-1 gene expression is growth state-regulated in cultured human epidermal keratinocytes during progression to confluence and postwounding. *Exp. Cell Res.* 227:123.
- 5 15. Jensen, P. J., Q. Wu, P. Janowitz, Y. Ando, and N. M. Schechter. 1995. Plasminogen activatorinhibitor type 2: an intracellular keratinocyte differentiation product that is incorporated into the cornified envelope. *Exp. Cell Res.* 217:65.
- 10 16. Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spotaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106:761.
- 15 17. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
18. Hopkins, P. C. and J. Whisstock. 1994. Function of maspin [letter; comment]. *Science* 265:1893.
- 20 19. Schick, C., Y. Kamachi, A. J. Bartuski, S. Cataltepe, N. M. Schechter, P.A. Pemberton, and G. A. Silverman. 1997. Sqamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinsases cathepsin G. And mast cell chymase. *J. Biol. Chem.* 272:1849.
- 25

Die Figuren zeigen:

- Abb. 1 zeigt das Autoradiogramm der Differential Display Analyse zur Identifizierung des ersten partiellen hurpin cDNA Klons (HUR 7) als UV-reprimierte Sequenz. Die entsprechende Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.
- Abb. 2 zeigt die schematische Darstellung der Organisation der hurpin cDNA-Klone voller Länge entsprechend der zugrundeliegenden Sequenzanalyse.
- Abb. 3 stellt die Ergebnisse des Homologievergleiches der Aminosäuresequenz von hurpiin mit verschiedenen bekannten Mitglieder des Ovalbumin-Zweiges der Familie der Serpine zusammen.
- Abb. 4 zeigt den Homologievergleich der Aminosäuresequenz von hurpin und dem „squamous cell carcinoma antigen“ (SCCA) 1 und SCCA 2. Identische Aminosäuren an gleicher Position sind entsprechend hervorgehoben. Die Position der in Serpinen konservierten Aminosäuren sind durch Balken oberhalb der Aminosäuren markiert. Schwarze Balken zeigen dabei in hurpin konservierte Aminosäuren an, während ungefüllte Balken eine Abweichung von der konservierten Aminosäure markieren. Schraffierte Balken zeigen Aminosäuren, die typischerweise bei Ovalbumin-Serpinen von der konservierten Aminosäure abweichen. Die bei inhibitorischen Serpinen konservierten Aminosäuren des reaktiven Zentrums in Position P_{17} - P_8 sind umrahmt und die Konsensussequenz für inhibitorische Serpine ist durch eine gestrichelte Linie unterhalb der hurpin-Sequenz markiert. Die Aminosäuren des reaktiven Zentrums in P-P-Position sind ebenfalls markiert.
- Abb. 5 zeigt das Autoradiogramm einer Hybridisierung des radioaktiv markierten cDNA-Inserts des hurpin Klones 1.1 gegen Gesamt-RNA aus bestrahlten und unbestrahlten HaCaT-Zellen.

- Abb. 6 RT-PCR Analyse zum Nachweis hurpin spezifischer Transkripte in humanen, kultivierten retinalen Pigmentepithelzellen (RPE), Iris-Epithelzellen (IPE), normaler Haut, primären, kultivierten Keratinozyten (NHK), der epidermalen Zelllinie HaCaT, sowie befallener (a) und unbefallener (u) Haut von drei Patienten mit Psoriasis.
- Abb. 7-9 Restriktionskarten der Plasmidvektoren. Bei den Plasmidvektoren handelt es sich um pBlueScript SK in die über Eco RI und Xho I die hurpin/PII3 cDNAs voller Länge kloniert sind.
- 10 Abb. 10 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Gefrierschnitte von psoriatischer und normaler Haut nach in situHybridisierung mit einer Hurpin-spezifischen, Digoxiginin-markierten anti-sense RNA-Sonde.
- Abb. 11 zeigt die Untersuchung der Interaktion des in vitro translierten, [³⁵S]-markierten Hurpin-Proteins mit verschiedenen Proteasen.

Patentansprüche:

1. Für einen Serin Protease Inhibitor codierende Nukleinsäure enthaltend ein
Gen gemäß der Sequenz ID1 oder ein Allel, Homolog oder ein Derivat
5 dieses Gens.
2. Für einen Serin Protease Inhibitor codierende Nukleinsäure enthaltend ein
Gen gemäß der Sequenz ID2 oder ein Allel, Homolog oder ein Derivat
dieses Gens.
10
3. Für einen Serin Protease Inhibitor codierende Nukleinsäure enthaltend ein
Gen gemäß der Sequenz ID3 oder Allel, Homolog oder ein Derivat dieses
Gens.
- 15 4. Für einen Serin Protease Inhibitor codierende Nukleinsäure enthaltend ein
Gen gemäß der Sequenz ID4 oder Allel, Homolog oder ein Derivat dieses
Gens.
5. Serin Protease Inhibitor, welcher durch eine Nukleinsäure nach einem der
20 Ansprüche 1 bis 4 codiert wird.
6. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, dessen Zellen einen durch eine
Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codierten Serin Protease
Inhibitor exprimieren.
25
7. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier nach Anspruch 5, wobei die
Expression in epidermalen Keratinozyten erfolgt.

8. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, wobei das Säugetier fremde DNS mit einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
9. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier nach Anspruch 8, wobei die fremde DNS einen Promotor für ein für epidermale Keratinozyten spezifisches Protein enthält und wobei dieser Promotor mit der Maßgabe angeordnet ist, daß durch den Promotor die Transkription der DNS nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kontrolliert wird.
10. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier nach einem der Ansprüche 6 bis 9, welches ein Säugetier aus der Gruppe der Rodenten ist.
11. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, welches erhältlich ist durch die folgenden Verfahrensschritte:
 - a) Einbau der cDNS-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in einen Expressionsvektor,
 - b) Einbringung des in Stufe a) erhaltenen Transgenvektors, vorzugsweise nach Linearisierung, in Pronuclei von befruchteten Oozyten aus einem nicht-menschlichen Säugetier
 - c) Implantation der in Stufe b) erhaltenen Oozyten in Ammentiere gleicher Spezies wie die Spenderspezies der Oozyten und Austragung von Nachkommantieren aus den Oozyten,
 - d) Genotypisierung und Selektion der in Stufe c) erhaltenen Nachkommantiere mit der Maßgabe, daß Zellen der selektierten Säugetiere einen durch eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 4 codierten Serin Protease Inhibitor exprimieren.
12. Transgenes, nicht-menschliches Säugetier, wobei der in Stufe a) verwendete Expressionsvektor einen Promotor für ein Protein enthält, welches für epidermale Keratinozyten spezifisch ist.

13. Zellgewebe, insbesondere epidermale Keratinozyten, aus einem Säugetier, nach einem der Ansprüche 5 bis 12.
- 5 14. Rekombinanter DNS Expressionsvektor enthaltend
- a) eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4
 - b) eine Promotor-Domäne für ein für epidermale Keratinozyten spezifisches Protein mittels welcher die Transkription der in A) definierten DNS-Sequenz steuerbar ist.
- 10 15. Verwendung eines rekombinanten Expressionsvektors nach Anspruch 14 zur Herstellung eines transgenen nicht-menschlichen Säugetiers oder eines Zellgewebes aus einem solchen Säugetier.
- 15 16. Verwendung eines transgenen nicht-menschlichen Säugetiers nach einem der Ansprüche 6 bis 12 oder eines Zellgewebes nach Anspruch 13 zur Untersuchung der Modulation der Expression eines Serin Protease Inhibitors nach Anspruch 5.
- 20 17. Verwendung eines transgenen nicht-menschlichen Säugetiers nach einem der Ansprüche 6 bis 12 oder eines Zellgewebes nach Anspruch 16 zur Untersuchung der Wirksamkeit von die Expression eines Serin Protease Inhibitors nach Anspruch 5 hemmenden Substanzen.
- 25 18. Verwendung eines transgenen nicht-menschlichen Säugetiers nach einem der Ansprüche 6 bis 12 oder eines Zellgewebes nach Anspruch 13 zur

Untersuchung der Pathogenese von epidermalen Tumoren, Psoriasis und UVB-geschädigten Hautzellen.

19. Antisense Oligonukleotid, welches an eine einzelsträngige Nukleinsäure
5 nach einem der Ansprüche 1 bis 4 bindet.
20. Antikörper, welcher spezifisch an einen Serin Protease Inhibitor nach
Anspruch 5 bindet.
- 10 21. Eine Protease die spezifisch mit einem Serin Protease Inhibitor nach Anspruch
5 intigriert.

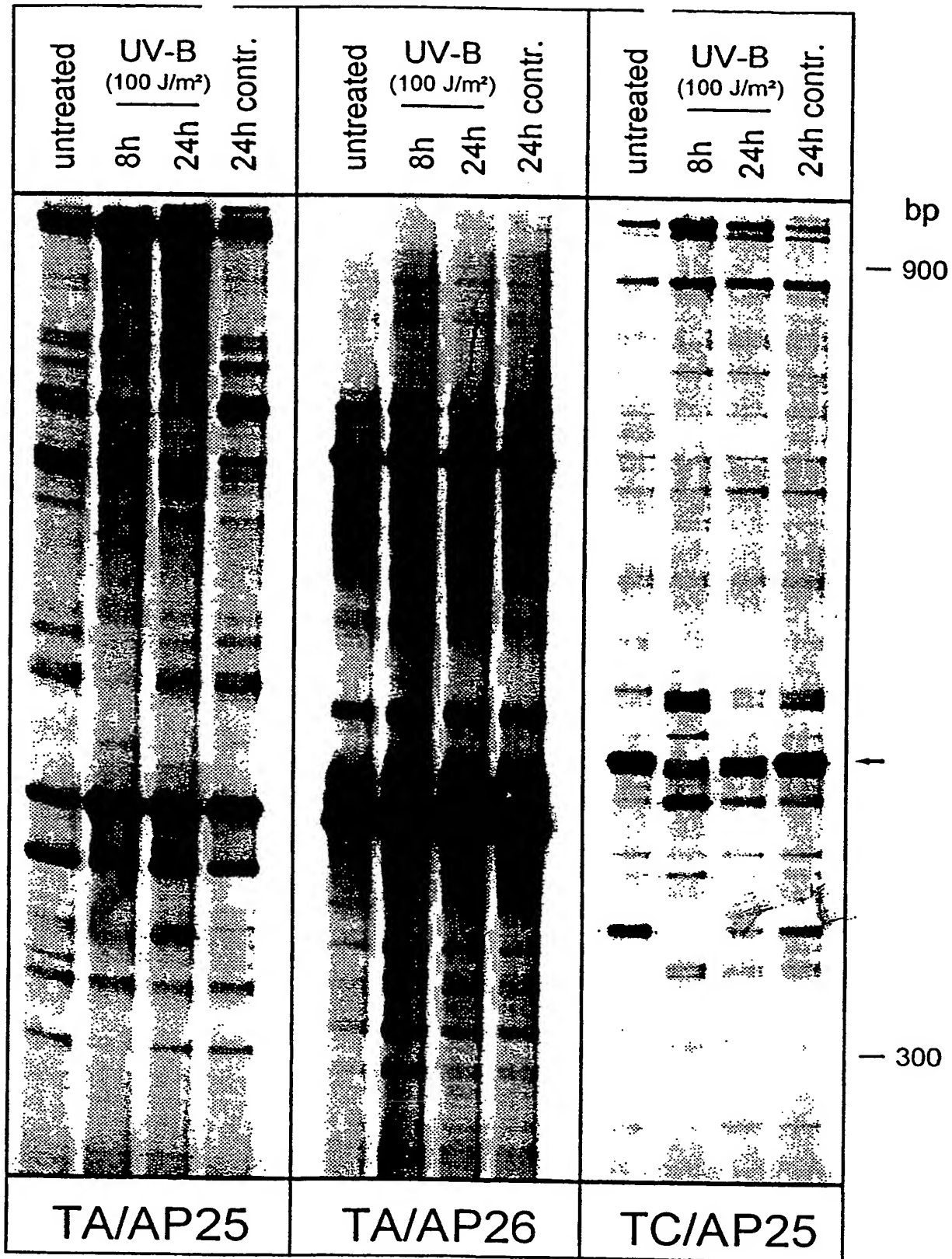


Abb. 1

ERSATZBLATT (REGEL 26)

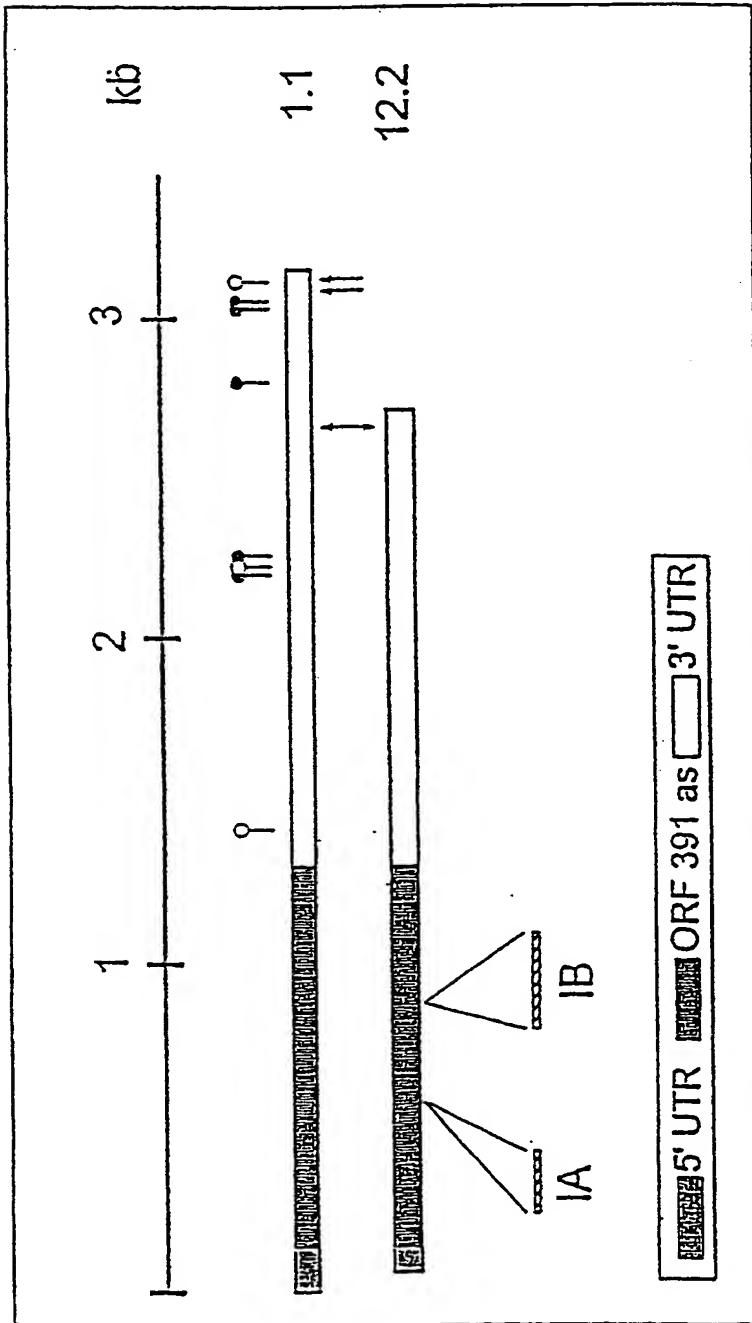


Fig. 2: Schematische Darstellung der Organisation der hurpin cDNA-Klone. Die unterschiedlich schraffierten Balken (siehe Legende) repräsentieren den 5' untranslatierten Bereich (5' UTR), den offenen Leserahmen (ORF) sowie den 3' untranslatierten Bereich (3' UTR) der cDNA-Klone. Die Position und Größe von zwei möglichen Intron-Sequenzen (IA, IB) ist ebenfalls angegeben. Die Position verschiedener "rapid degradation"-Motive im 3' UTR sind durch (ATTTA) und (AT_nA) markiert. Die Pfeile bezeichnen die Lage der identifizierten Polyadenylierungssignale.

Fig. 3

Aminosäurehomologie zwischen hurpin und bekannten Ovalbumin-Serpinen

Nr.	% Homologie zu hurpin	Serpin	swissprot Zugriffsnummer	Gensymbol
1.	59.1	Squamous cell carcinoma antigen 1	P29508	SCCA1/SCCA
2.	58.5	Squamous cell carcinoma antigen 2	P48594	SCCA2
3.	43.5	Bomapin	P48595	PI 10
4.	38.8	Gene Y Protein	P01014	-Y
5.	38.0	Leukocyte elastase inhibitor (LEI/EI)	P30740	ELANH2/PI2
6.	36.7	Placental thrombin inhibitor	P35237	PI 6
7.	35.8	Cytoplasmic antiproteinase	P50453	PI 9 /CAP3
8.	35.1	Ovalbumin	P01012	-
9.	33.1	Plasminogen activator inhibitor-2	P05120	PAI-2
10.	32.3	Cytoplasmic antiproteinase 2	P50452	PI 8/CAP2
11.	27.3	Antithrombin-III precursor	P01008	AT3
12.	26.0	Maspin precursor	P36952	PI 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

hurpin	1	MDSLGA VSTR LGFDL FKELKKTNDGNIFFSPVGI L T	36
SCCA2	1	MNSLSEANTKFMFDLFQQFRKSKENNIFYSPISITS	35
SCCA1	1	MNSLSEANTKFMFDLFQQFRKSKENNIFYSPISITS	36
hurpin	37	ALGMVLLGTRGATASQLEEVFHSSEKETKSSRIKAE E	72
SCCA2	37	ALGMVLLGAKDNTAQQISKVLHFDQVTENTTEKAAT	72
SCCA1	37	ALGMVLLGAKDNTAQQIKKVLHFDQVTENTTGKAAT	72
hurpin	73	KEVIEN TEAVHQFQKFLTEISKLTNDYELNITNRL	108
SCCA2	73	YHVD R -SGNVHHOFOKLLTEFNKSTDAYELKIANKL	107
SCCA1	73	YHVD R -SGNVHHOFOKLLTEFNKSTDAYELKIANKL	107
hurpin	109	FGEKTYLFLQKYLDYVEKYTHASLEPVD FVNAADES	144
SCCA2	108	FGEKTYQFLQEYLD A I K K F Y O T S V E S T D F A N A P E E S	143
SCCA1	108	FGEKTYLFLQEYLD A I K K F Y O T S V E S D F A N A P E E S	143
hurpin	145	RKKINSWVESKTNEKIKDLFPDGSISSTKLVLVNM	180
SCCA2	144	RKKINSWVESQTNEKIKNLFPGTIGNDTTLVLVNA	179
SCCA1	144	RKKINSWVESQTNEKIKNLIPEGNIGSNTTLVLVNA	179
hurpin	181	VYFKGQWDR FFKKENTKEEKFWMNKSTSKSVQMMTC	215
SCCA2	180	IYFKGQWENKFKKENTKEEKFWPNKNTYKSVQMMRO	215
SCCA1	180	IYFKGQWEKKFNKEOTKEEKFWPNKNTYKSIQMMRO	215
hurpin	217	SHSFSFTFLEDLQAKILGIPYKNNDLSMFLVLLPNDI	252
SCCA2	216	YNSFN FALLEDVQAKVLEIPYKGKDLSMIVLLPNEI	251
SCCA1	216	YTSFHFASLEDVQAKVLEIPYKGKDLSMIVLLPNEI	251
hurpin	253	DGLEKIIDKISPEKLV E W T S P G H M E E R K V N L H L P R F	288
SCCA2	252	DGLQKLEEKLTAEKLM E W T S L Q N M R E T C V D L H L P R F	287
SCCA1	252	DGLQKLEEKLTAEKLM E W T S L Q N M R E T R V D L H L P R F	287
hurpin	289	EVEDGGYDLQAVLAAMGMGDAFSEHKADYSGMSSGSG	324
SCCA2	288	KMEESYDLKDTLRTMG MVNI FNG -DADLSGMTWSHG	322
SCCA1	288	KVEESYDLKDTLRTMG MVDI FNG -DADLSGMTGSRG	322
hurpin	325	LYAOKFLHSSFVA V T E E G T E A A A A T G I G F T V T S A P G	359
SCCA2	323	LSVSKVLHKAFVEVTEEGVEAAAATAVVVVELSSPS	353
SCCA1	323	LVLSGVLHKAFVEVTEEGAEAAAATAVVGFGSSPT S	353
hurpin	360	H-ENVHCNHPFLFFIRHNESNSILFFGRFSSP	391
SCCA2	359	TNEEFHCNHPFLFFIRQNKTNSILFYGRFSSP	390
SCCA1	359	TNEEFHCNHPFLFFIRONKTNSILFYGRFSSP	390

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig. 4

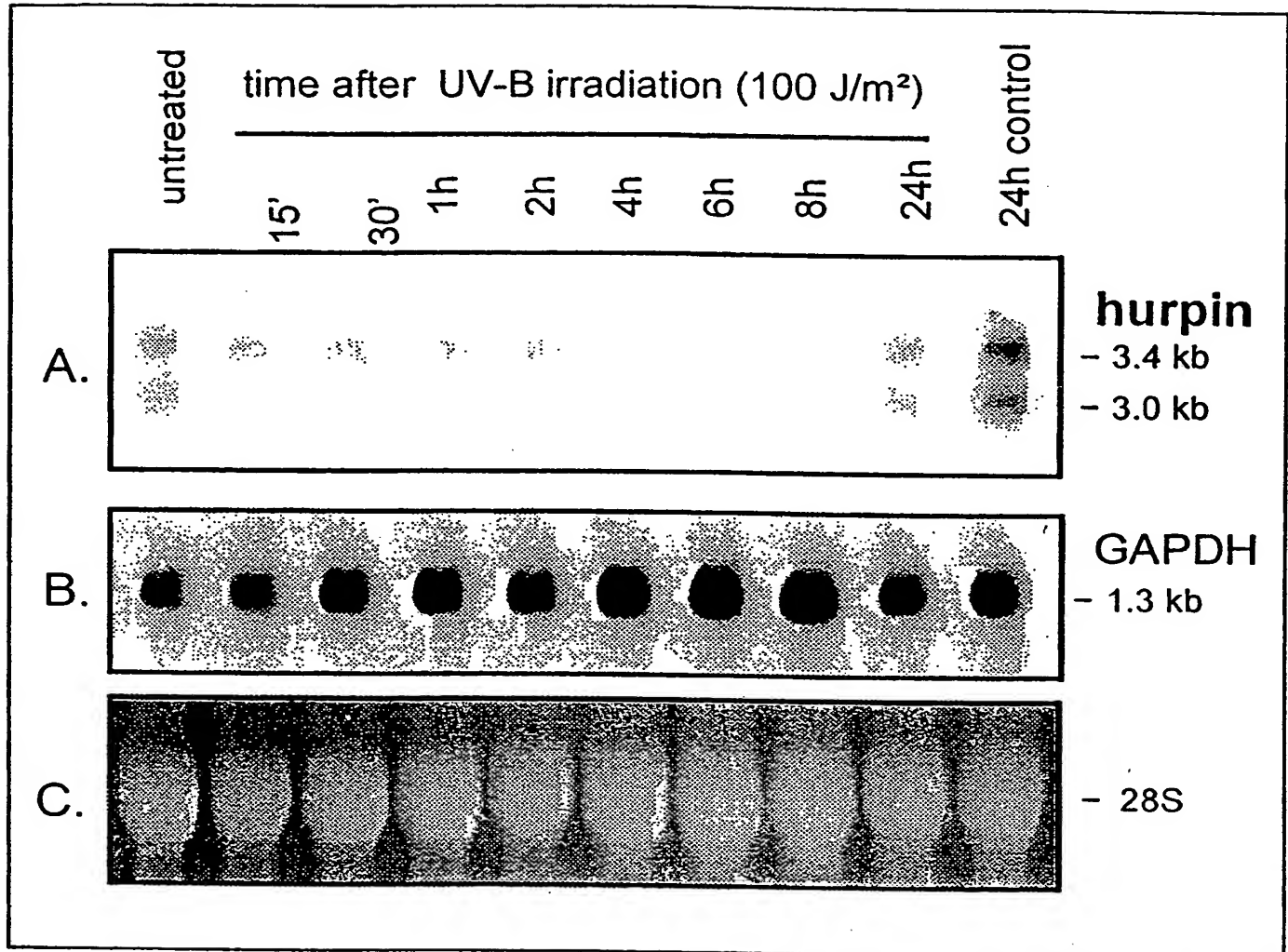


Abb. 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

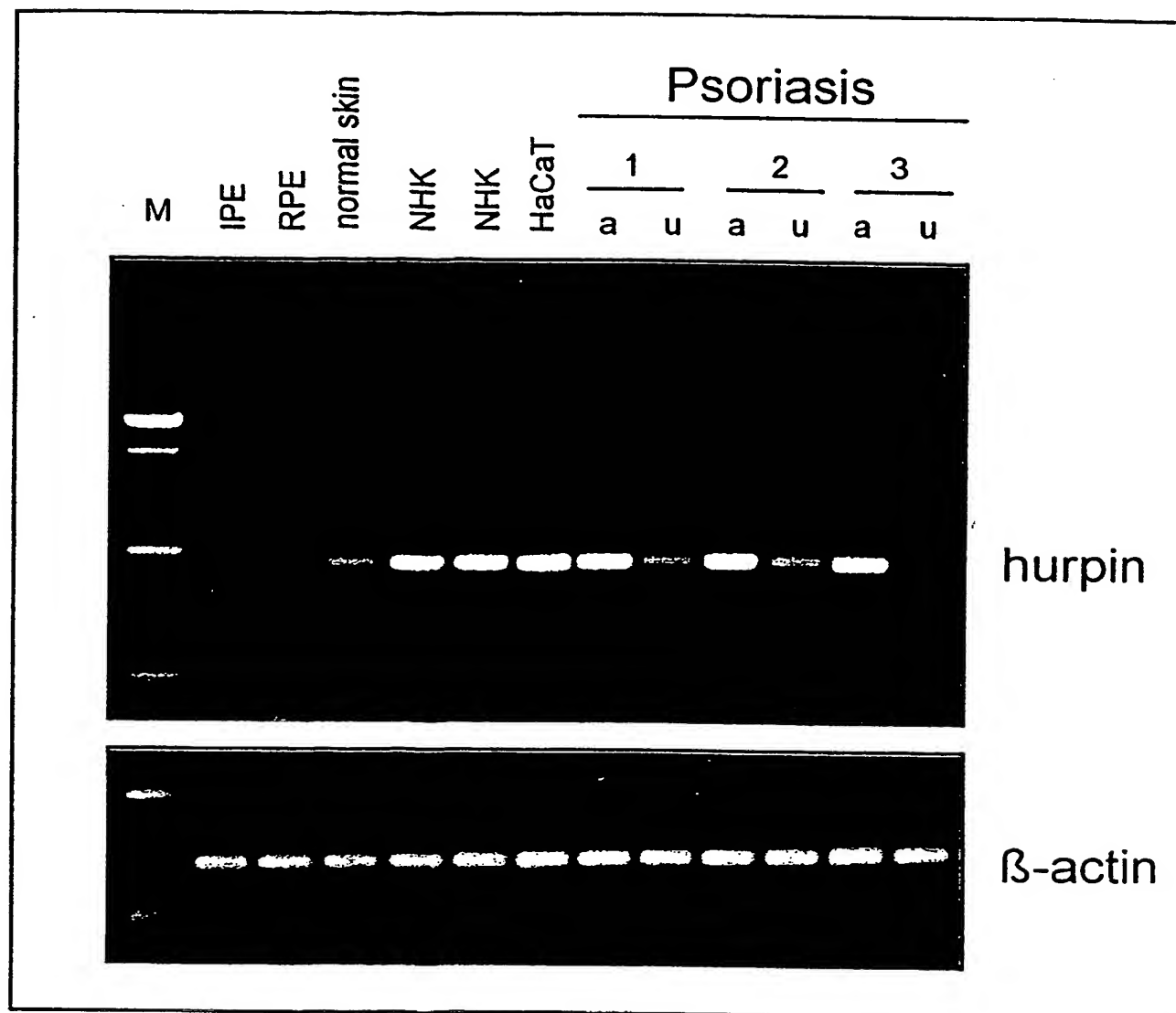


Abb. 6

7/10

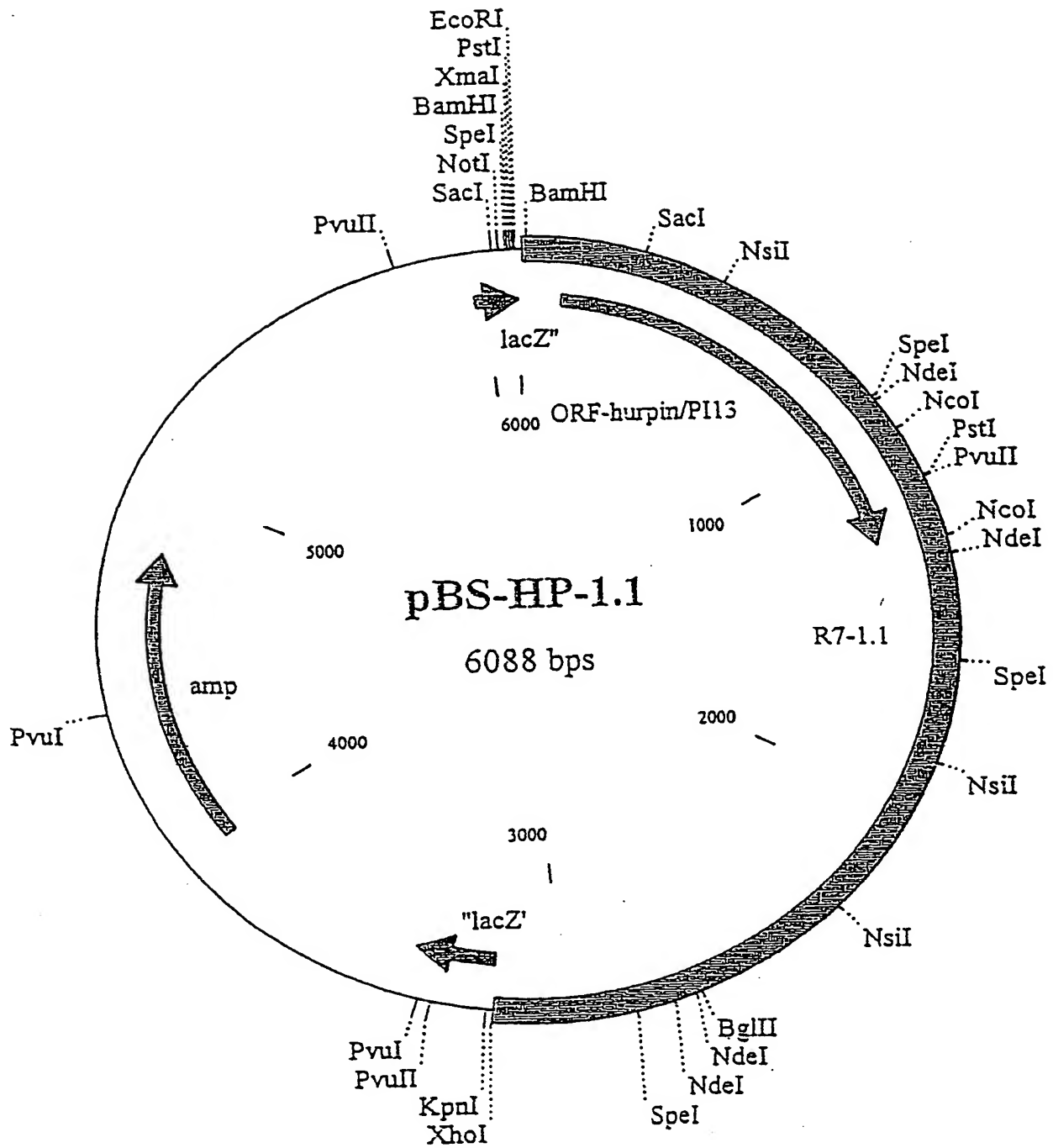


Fig. 7

8/10

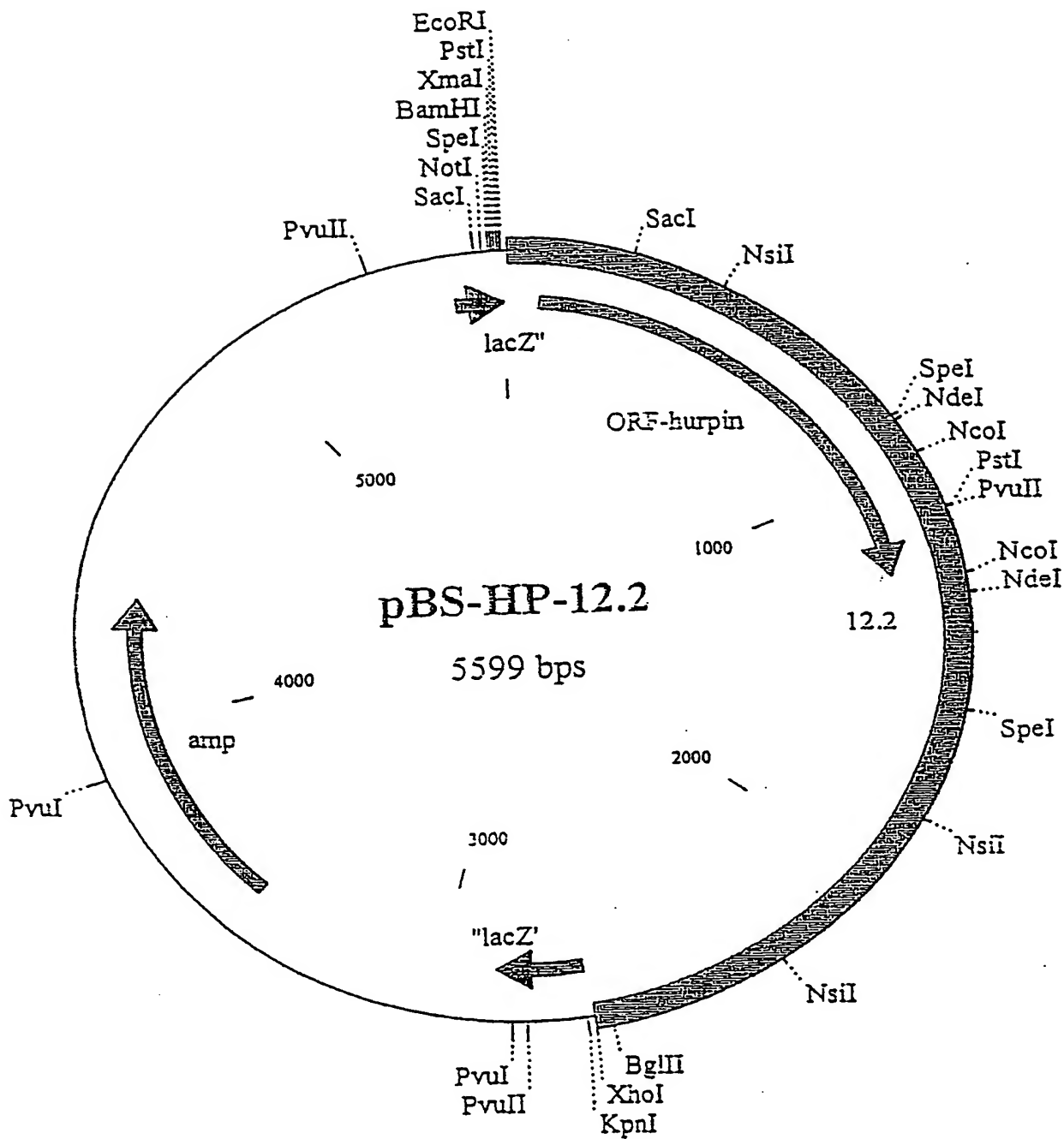


Fig. 8

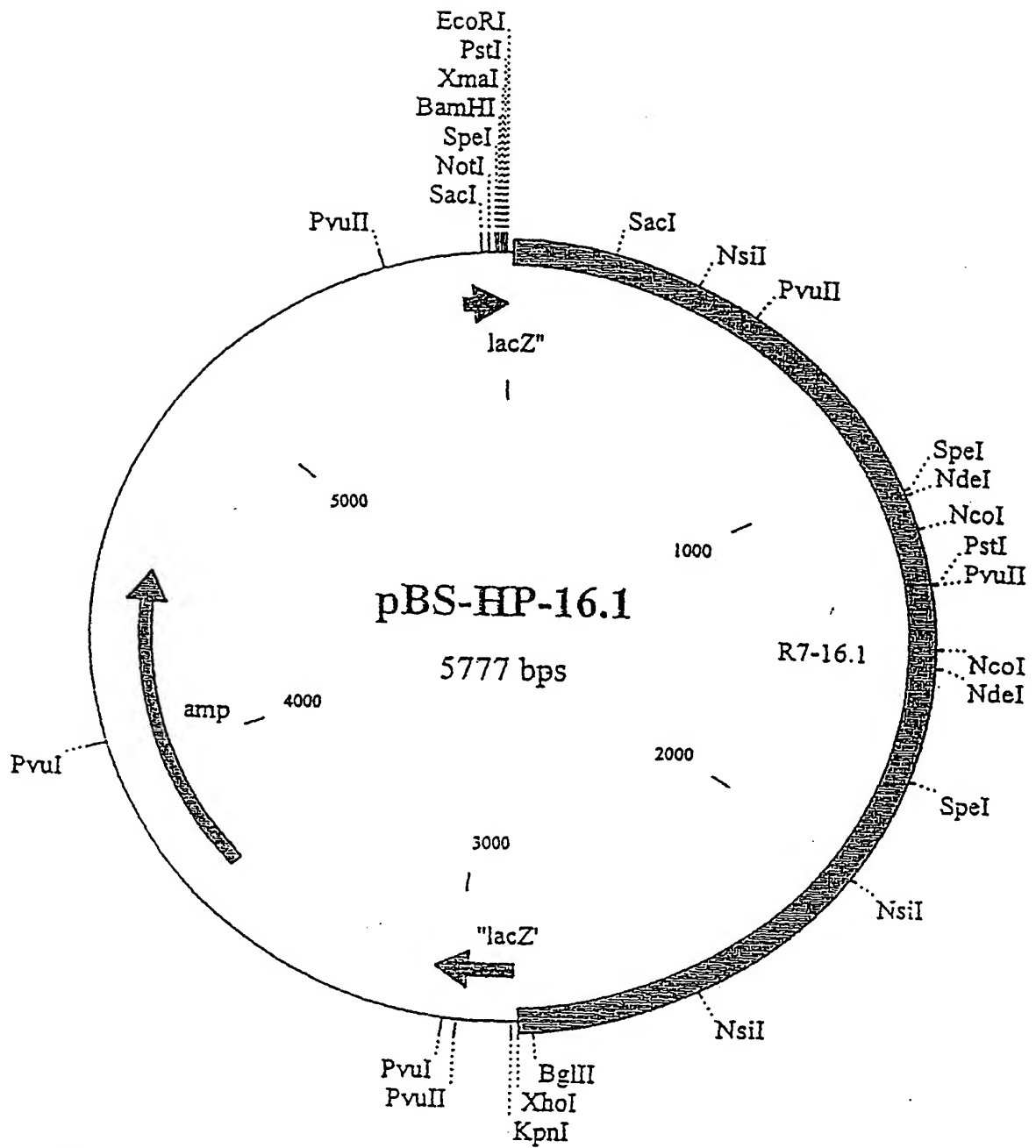
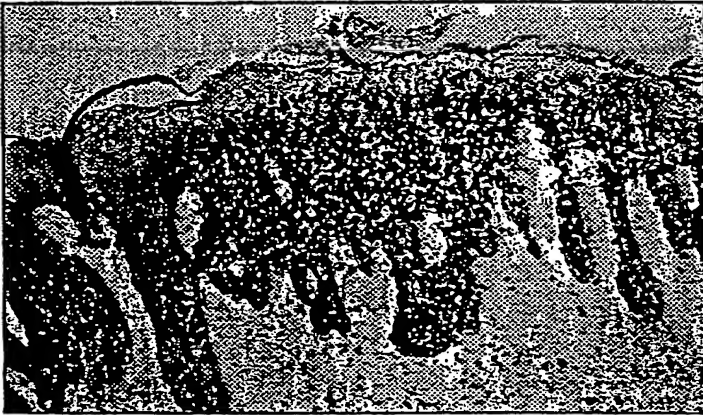


Fig. 9

Psoriatische Haut



Normale Haut

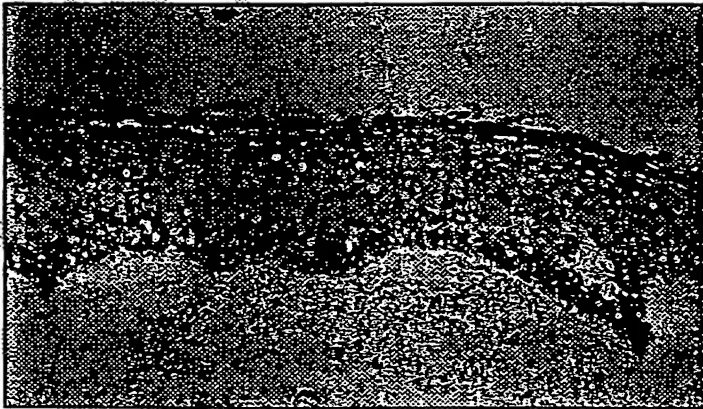


Abb. 10

In-situ Hybridisierung
mit einer HRPin-
mRNA-Sonde auf
Gefrierschnitten
humaner Haut.

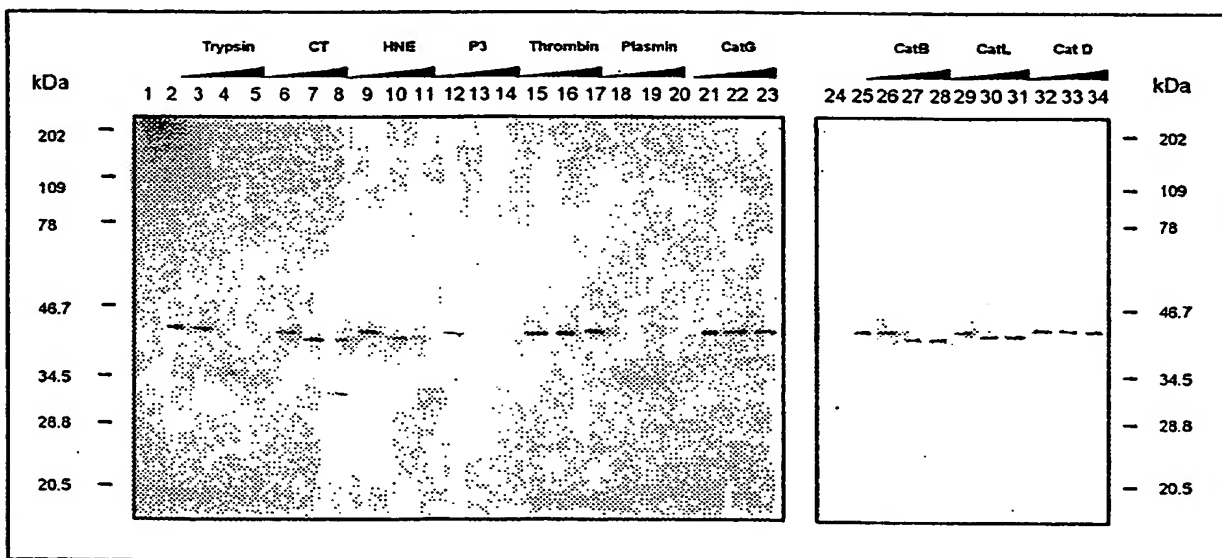


Abb. 11 HRPin-Interaktion mit bekannten Proteasen

ERSATZBLATT (REGEL 26)

SEQUENCE LISTING

<110> Abts Dr., Harry F.

<120> Fu r einen Serin Protease Inhibitor codierende
Nukleinsaeure

<130> 2

<140> PCT/ EP99/02148

<141> 1999-03-29

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3143

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (103)..(1278)

<400> 1

```

ctataaatta aggatcccag ctacttaatt gacttatgct tcctagtctg ttgcccagcc 60
accaccgtct ctccaaaaac ccgagggtctc gctaaaatca tc atg gat tca ctt      114
                                     Met Asp Ser Leu
                                     1
ggc gcc gtc agc act cga ctt ggg ttt gat ctt ttc aaa gag ctg aag      162
Gly Ala Val Ser Thr Arg Leu Gly Phe Asp Leu Phe Lys Glu Leu Lys
  5              10              15              20
aaa aca aat gat ggc aac atc ttc ttt tcc cct gtg ggc atc ttg act      210
Lys Thr Asn Asp Gly Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Gly Ile Leu Thr
          25              30              35
gca att ggc atg gtc ctc ctg ggg acc cga gga gcc acc gct tcc cag      258
Ala Ile Gly Met Val Leu Leu Gly Thr Arg Gly Ala Thr Ala Ser Gln
      40              45              50
ttg gag gag gtg ttt cac tct gaa aaa gag acg aag agc tca aga ata      306
Leu Glu Glu Val Phe His Ser Glu Lys Glu Thr Lys Ser Ser Arg Ile
      55              60              65

```

ERSATZBLATT (REGEL 26)

aag gct gaa gaa aaa gag gtg att gag aac aca gaa gca gta cat caa	354
Lys Ala Glu Glu Lys Glu Val Ile Glu Asn Thr Glu Ala Val His Gln	
70 75 80	
caa ttc caa aag ttt ttg act gaa ata agc aaa ctc act aat gat tat	402
Gln Phe Gln Lys Phe Leu Thr Glu Ile Ser Lys Leu Thr Asn Asp Tyr	
85 90 95 100	
gaa ctg aac ata acc aac agg ctg ttt gga gaa aaa aca tac ctc ttc	450
Glu Leu Asn Ile Thr Asn Arg Leu Phe Gly Glu Lys Thr Tyr Leu Phe	
105 110 115	
ctt caa aaa tac tta gat tat gtt gaa aaa tat tat cat gca tct ctg	498
Leu Gln Lys Tyr Leu Asp Tyr Val Glu Lys Tyr Tyr His Ala Ser Leu	
120 125 130	
gaa cct gtt gat ttt gta aat gca gcc gat gaa agt cga aag aag att	546
Glu Pro Val Asp Phe Val Asn Ala Ala Asp Glu Ser Arg Lys Lys Ile	
135 140 145	
aat tcc tgg gtt gaa agc aaa aca aat gaa aaa atc aag gac ttg ttc	594
Asn Ser Trp Val Glu Ser Lys Thr Asn Glu Lys Ile Lys Asp Leu Phe	
150 155 160	
cca gat ggc tct att agt agc tct acc aag ctg gtg ctg gtg aac atg	642
Pro Asp Gly Ser Ile Ser Ser Ser Thr Lys Leu Val Leu Val Asn Met	
165 170 175 180	
gtt tat ttt aaa ggg caa tgg gac agg gag ttt aag aaa gaa aat act	690
Val Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Asp Arg Glu Phe Lys Lys Glu Asn Thr	
185 190 195	
aag gaa gag aaa ttt tgg atg aat aag agc aca agt aaa tct gta cag	738
Lys Glu Glu Lys Phe Trp Met Asn Lys Ser Thr Ser Lys Ser Val Gln	
200 205 210	
atg atg aca cag agc cat tcc ttt agc ttc act ttc ctg gag gac ttg	786
Met Met Thr Gln Ser His Ser Phe Ser Phe Thr Phe Leu Glu Asp Leu	
215 220 225	
cag gcc aaa att cta ggg att cca tat aaa aac aac gac cta agc atg	834
Gln Ala Lys Ile Leu Gly Ile Pro Tyr Lys Asn Asn Asp Leu Ser Met	
230 235 240	
ttt gtg ctt ctg ccc aac gac atc gat ggc ctg gag aag ata ata gat	882
Phe Val Leu Leu Pro Asn Asp Ile Asp Gly Leu Glu Lys Ile Ile Asp	
245 250 255 260	

ERSATZBLATT (REGEL 26)

aaa ata agt cct gag aaa ttg gta gag tgg act agt cca ggg cat atg 930
 Lys Ile Ser Pro Glu Lys Leu Val Glu Trp Thr Ser Pro Gly His Met
 265 270 275

gaa gaa aga aag gtg aat ctg cac ttg ccc cgg ttt gag gtg gag gac 978
 Glu Glu Arg Lys Val Asn Leu His Leu Pro Arg Phe Glu Val Glu Asp
 280 285 290

ggt tac gat cta cag gcg gtc ctg gct gcc atg ggg atg ggc gat gcc 1026
 Gly Tyr Asp Leu Gln Ala Val Leu Ala Ala Met Gly Met Gly Asp Ala
 295 300 305

ttc agt gag cac aaa gcc gac tac tcg gga atg tcg tca ggc tcc ggg 1074
 Phe Ser Glu His Lys Ala Asp Tyr Ser Gly Met Ser Ser Gly Ser Gly
 310 315 320

ttg tac gcc cag aag ttc ctg cac agt tcc ttt gtg gca gta act gag 1122
 Leu Tyr Ala Gln Lys Phe Leu His Ser Ser Phe Val Ala Val Thr Glu
 325 330 335 340

gaa ggc acc gag gct gca gct gcc acc ggc ata ggc ttt act gtc aca 1170
 Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ile Gly Phe Thr Val Thr
 345 350 355

tcc gcc cca ggt cat gaa aat gtt cac tgc aat cat ccc ttc ctg ttc 1218
 Ser Ala Pro Gly His Glu Asn Val His Cys Asn His Pro Phe Leu Phe
 360 365 370

ttc atc agg cac aat gaa tcc aac agc atc ctc ttc ttc ggc aga ttt 1266
 Phe Ile Arg His Asn Glu Ser Asn Ser Ile Leu Phe Phe Gly Arg Phe
 375 380 385

tct tct cct taa gatgatcggt gccatggcat tgctgctttt agcaaaaaaac 1318
 Ser Ser Pro
 390

aactaccagt gttactcata tgattatgaa aatcggtccat tctttttaa at gttgtctcac 1378

ttgcatttcc agtcttggcc atcaaatcaa tgatttaatg actccaataa tgtgtgtgtt 1438

tataaccatc ctcgaaagtg aaatgtcctt ttttttgtgc catgcgtaag gtgagtcata 1498

ccaaacctca ttgataatct ccccttttgtt ttccttttgaa agtaaattgg tatctttag 1558

ttttgtgcac acgaaaggag agaaagtctc tccagtaaag agtacgaact agtaattttg 1618

ggggtctct ctaattctgg tattttgaca tgttataata cgcaagtaaa ataaaacaat 1678

ERSATZBLATT (REGEL 26)

agtttactca gctcatgtta ctattcccca acagatattg tggcaaatca cacataggaa 1738
agaggatttg ggaatacagt agcaaaacat aaattaaaac tcaaatgcc aggacaaaat 1798
aaaacaatat accagatgga gaggatgcc gtattttcat cttccattct aacattatcc 1858
attgttagat gcataagcat tttgatattg tgtaataaat gtggtatttg agaagataaa 1918
tgatgtagtt gatcagtaat cctcctctat caccttttta gactttgtaa ggtaaatatt 1978
tggactaact tttagaaaag tttccctttt tttctccatt tacatttttc tggttttttt 2038
ttttttttt gagtgaggta cgagtattac caaatgatat tttctgaaga tgcttttttg 2098
aaagctctga atctatacct aatgctctta attattggct tgtttcattt ttttcccca 2158
gtttttaaca agatcacata actggcttat ttttaacagc tttgtcaaac tacaatttac 2218
atgccgtaaa atgtacacac tgtaatttta taattcattg acttttagta aattttctag 2278
cgttatgcat cgccacaatc cagttttaga atatttccat gaccctaaga agtttcctca 2338
tgtctattaa tattcccaat cctaggcacc actgagttgt tttctgtctt tataagtttt 2398
tctttctaca tcttatataa atggaatcat aatacatgta gtattttgtg tctggcgtct 2458
tgcacttagc atggtgttct tgaggttcat ctggtgtagt atgtattgat acttaggatt 2518
tttttattgc cgaatactat tccattgcat ggaaaagacc tattttattt ctaggttcac 2578
cagttgaggg acatttgat tgttcccact tcttgggctg ttaggaataa tgttgctctg 2638
aacatgtaaa taaagatctt tgtgttcaca tatgtttttc attttctgtt ggggagattc 2698
cctaggctag aaattgctgg gccatatgaa aaatcaatag ttagctttgt aagaaacagt 2758
caaactgtt tccaacgtg acattttata tccccaccag gaatgttaa aactagtgtc 2818
ttcaaactct caccaacatc caggattgtg tctttatgat tatagccatt tttgtaggta 2878
caaagtggca tctcatggtg gttttaattt gcatttccat aatatctaatt taggttgagc 2938
tttttttatg tgcttattgg ccatttgttt gactttgttt ggtgaaatgt atacaaatca 2998
tttgctcatt ttttaatttg gttgtctgtc ttgtcttctc attttattga gttaaattgag 3058
ttcttaataa tctctggctt acaagtcctt aatttatcaa atatatgata cgtggacatt 3118

ERSATZBLATT (REGEL 26)

tcctcataaa aaaaaaaaaa aaaaaa

3143

<210> 2

<211> 391

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Ser Leu Gly Ala Val Ser Thr Arg Leu Gly Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15

Lys Glu Leu Lys Lys Thr Asn Asp Gly Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val
 20 25 30

Gly Ile Leu Thr Ala Ile Gly Met Val Leu Leu Gly Thr Arg Gly Ala
 35 40 45

Thr Ala Ser Gln Leu Glu Glu Val Phe His Ser Glu Lys Glu Thr Lys
 50 55 60

Ser Ser Arg Ile Lys Ala Glu Glu Lys Glu Val Ile Glu Asn Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Val His Gln Gln Phe Gln Lys Phe Leu Thr Glu Ile Ser Lys Leu
 85 90 95

Thr Asn Asp Tyr Glu Leu Asn Ile Thr Asn Arg Leu Phe Gly Glu Lys
 100 105 110

Thr Tyr Leu Phe Leu Gln Lys Tyr Leu Asp Tyr Val Glu Lys Tyr Tyr
 115 120 125

His Ala Ser Leu Glu Pro Val Asp Phe Val Asn Ala Ala Asp Glu Ser
 130 135 140

Arg Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Lys Thr Asn Glu Lys Ile
 145 150 155 160

Lys Asp Leu Phe Pro Asp Gly Ser Ile Ser Ser Ser Thr Lys Leu Val
 165 170 175

Leu Val Asn Met Val Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Asp Arg Glu Phe Lys
 180 185 190

Lys Glu Asn Thr Lys Glu Glu Lys Phe Trp Met Asn Lys Ser Thr Ser
 195 200 205

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Lys Ser Val Gln Met Met Thr Gln Ser His Ser Phe Ser Phe Thr Phe
 210 215 220
 Leu Glu Asp Leu Gln Ala Lys Ile Leu Gly Ile Pro Tyr Lys Asn Asn
 225 230 235 240
 Asp Leu Ser Met Phe Val Leu Leu Pro Asn Asp Ile Asp Gly Leu Glu
 245 250 255
 Lys Ile Ile Asp Lys Ile Ser Pro Glu Lys Leu Val Glu Trp Thr Ser
 260 265 270
 Pro Gly His Met Glu Glu Arg Lys Val Asn Leu His Leu Pro Arg Phe
 275 280 285
 Glu Val Glu Asp Gly Tyr Asp Leu Gln Ala Val Leu Ala Ala Met Gly
 290 295 300
 Met Gly Asp Ala Phe Ser Glu His Lys Ala Asp Tyr Ser Gly Met Ser
 305 310 315 320
 Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Ala Gln Lys Phe Leu His Ser Ser Phe Val
 325 330 335
 Ala Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Thr Gly Ile Gly
 340 345 350
 Phe Thr Val Thr Ser Ala Pro Gly His Glu Asn Val His Cys Asn His
 355 360 365
 Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Glu Ser Asn Ser Ile Leu Phe
 370 375 380
 Phe Gly Arg Phe Ser Ser Pro
 385 390

<210> 3

<211> 2654

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (71)..(1246)

<400> 3

cttatgcttc ctagttcggt gccagccac caccgtctct ccaaaaaccc gaggtctcgc 60

taaaatcatc atg gat tca ctt ggc gcc gtc agc act cga ctt ggg ttt	109
Met Asp Ser Leu Gly Ala Val Ser Thr Arg Leu Gly Phe	
1 5 10	
gat ctt ttc aaa gag ctg aag aaa aca aat gat ggc aac atc ttc ttt	157
Asp Leu Phe Lys Glu Leu Lys Lys Thr Asn Asp Gly Asn Ile Phe Phe	
15 20 25	
tcc cct gtg ggc atc ttg act gca att ggc atg gtc ctc ctg ggg acc	205
Ser Pro Val Gly Ile Leu Thr Ala Ile Gly Met Val Leu Leu Gly Thr	
30 35 40 45	
cga gga gcc acc gct tcc cag ttg gag gag gtg ttt cac tct gaa aaa	253
Arg Gly Ala Thr Ala Ser Gln Leu Glu Glu Val Phe His Ser Glu Lys	
50 55 60	
gag acg aag agc tca aga ata aag gct gaa gaa aaa gag gtg att gag	301
Glu Thr Lys Ser Ser Arg Ile Lys Ala Glu Glu Lys Glu Val Ile Glu	
65 70 75	
aac aca gaa gca gta cat caa caa ttc caa aag ttt ttg act gaa ata	349
Asn Thr Glu Ala Val His Gln Gln Phe Gln Lys Phe Leu Thr Glu Ile	
80 85 90	
agc aaa ctc act aat gat tat gaa ctg aac ata acc aac agg ctg ttt	397
Ser Lys Leu Thr Asn Asp Tyr Glu Leu Asn Ile Thr Asn Arg Leu Phe	
95 100 105	
gga gaa aaa aca tac ctc ttc ctt caa aaa tac tta gat tat gtt gaa	445
Gly Glu Lys Thr Tyr Leu Phe Leu Gln Lys Tyr Leu Asp Tyr Val Glu	
110 115 120 125	
aaa tat tat cat gca tct ctg gaa cct gtt gat ttt gta aat gca gcc	493
Lys Tyr Tyr His Ala Ser Leu Glu Pro Val Asp Phe Val Asn Ala Ala	
130 135 140	
gat gaa agt cga aag aag att aat tcc tgg gtt gaa agc aaa aca aat	541
Asp Glu Ser Arg Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Lys Thr Asn	
145 150 155	
gaa aaa atc aag gac ttg ttc cca gat ggc tct att agt agc tct acc	589
Glu Lys Ile Lys Asp Leu Phe Pro Asp Gly Ser Ile Ser Ser Ser Thr	
160 165 170	
aag ctg gtg ctg gtg aac atg gtt tat ttt aaa ggg caa tgg gac agg	637
Lys Leu Val Leu Val Asn Met Val Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Asp Arg	
175 180 185	

ERSATZBLATT (REGEL 26)

gag ttt aag aaa gaa aat act aag gaa gag aaa ttt tgg atg aat aag	685
Glu Phe Lys Lys Glu Asn Thr Lys Glu Glu Lys Phe Trp Met Asn Lys	
190 195 200 205	
agc aca agt aaa tct gta cag atg atg aca cag agc cat tcc ttt agc	733
Ser Thr Ser Lys Ser Val Gln Met Met Thr Gln Ser His Ser Phe Ser	
210 215 220	
ttc act ttc ctg gag gac ttg cag gcc aaa att cta ggg att cca tat	781
Phe Thr Phe Leu Glu Asp Leu Gln Ala Lys Ile Leu Gly Ile Pro Tyr	
225 230 235	
aaa aac aac gac cta agc atg ttt gtg ctt ctg ccc aac gac atc gat	829
Lys Asn Asn Asp Leu Ser Met Phe Val Leu Leu Pro Asn Asp Ile Asp	
240 245 250	
ggc ctg gag aag ata ata gat aaa ata agt cct gag aaa ttg gta gag	877
Gly Leu Glu Lys Ile Ile Asp Lys Ile Ser Pro Glu Lys Leu Val Glu	
255 260 265	
tgg act agt cca ggg cat atg gaa gaa aga aag gtg aat ctg cac ttg	925
Trp Thr Ser Pro Gly His Met Glu Glu Arg Lys Val Asn Leu His Leu	
270 275 280 285	
ccc cgg ttt gag gtg gag gac ggt tac gat cta cag gcg gtc ctg gct	973
Pro Arg Phe Glu Val Glu Asp Gly Tyr Asp Leu Gln Ala Val Leu Ala	
290 295 300	
gcc atg ggg atg ggc gat gcc ttc agt gag cac aaa gcc gac tac tcg	1021
Ala Met Gly Met Gly Asp Ala Phe Ser Glu His Lys Ala Asp Tyr Ser	
305 310 315	
gga atg tcg tca ggc tcc ggg ttg tac gcc cag aag ttc ctg cac agt	1069
Gly Met Ser Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Ala Gln Lys Phe Leu His Ser	
320 325 330	
tcc ttt gtg gca gta act gag gaa ggc acc gag gct gca gct gcc acc	1117
Ser Phe Val Ala Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Thr	
335 340 345	
ggc ata ggc ttt act gtc aca tcc gcc cca ggt cat gaa aat gtt cac	1165
Gly Ile Gly Phe Thr Val Thr Ser Ala Pro Gly His Glu Asn Val His	
350 355 360 365	
tgc aat cat ccc ttc ctg ttc ttc atc agg cac aat gaa tcc aac agc	1213
Cys Asn His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Glu Ser Asn Ser	
370 375 380	

ERSATZBLATT (REGEL 26)

atc ctc ttc ttc ggc aga ttt tct tct cct taa gatgatcggt gccatggcat 1266
 Ile Leu Phe Phe Gly Arg Phe Ser Ser Pro
 385 390

tgctgctttt agcaaaaaac aactaccagt gttactcata tgattatgaa aatcgtccat 1326
 tcttttaaat gttgtctcac ttgcatttcc agtcttggcc atcaaataca tgatttaatg 1386
 actccaataa tgtgtgtgtt tataaccatc ctcgaaagtg aaatgtcctt ttttttgtgc 1446
 catgcgtaag gtgagtcaaa ccaaacctca ttgataatct ccccttgggt ttcctttgaa 1506
 agtaaattgg tatctttagt ttttgtgcac acgaaaggag agaaagtttc tccagtaaag 1566
 agtacgaact agtaattttg gggggtctct ctaattctgg tattttgaca tgttataata 1626
 cgcaagtaaa ataaaacaat agtttactca gctcatgtta ctattcccca acagatattg 1686
 tggcaaatca cacataggaa agaggatttg ggaatacagt agcaaaacat aaattaaaac 1746
 tcaaatgccc aggacaaaat aaaacaatat accagatgga gaggatgccc gtattttcat 1806
 ctccattctt aacattatcc attgttagat gcataagcat tttgatattg tgtaataaat 1866
 gtggtatttg agaagataaa tgatgtagtt gatcagtaat cctcctctat caccttttta 1926
 gactttgtaa ggtaaatatt tggactaact tttagaaaag tttccctttt tttctccatt 1986
 tacatttttc tgggtttttt tttttttttt gagtgaggta cgagtattac caaatgatat 2046
 tttctgaaga tgcttttttg aaagctctga atctatacct aatgctctta attattggct 2106
 tgtttcattt ttttctcca gtttttaaca agatcacata actggcttat ttttaacagc 2166
 tttgtcaaac tacaatttac atgccgtaaa atgtacacac tgtaatttta taattcattg 2226
 acttttagta aattttctag cgttatgcat cgccacaatc cagttttaga atatttccat 2286
 gaccctaaga agtttctca tgtctattaa tattcccaat cctaggcacc actgagttgt 2346
 tttctgtctt tataagtttt tctttctaca tcttatataa atggaatcat aatacatgta 2406
 gtattttgtg tctggcgtct tgcacttagc atggtgttct tgaggttcat ctgtttagt 2466
 atgtattgat acttaggatt tttttattgc cgaatactat tccattgcat ggaaaagacc 2526
 tattttattt ctaggttcac cagttgaggg acatttggat tgttcccaact tcttgggctg 2586

ERSATZBLATT (REGEL 26)

ttaggaataa tgttgctctg aacatgtaaa taaagatctt tgtgttcttt tttttttttt 2646

tttttttt

2654

<210> 4

<211> 391

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Ser Leu Gly Ala Val Ser Thr Arg Leu Gly Phe Asp Leu Phe
1 5 10 15

Lys Glu Leu Lys Lys Thr Asn Asp Gly Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val
20 25 30

Gly Ile Leu Thr Ala Ile Gly Met Val Leu Leu Gly Thr Arg Gly Ala
35 40 45

Thr Ala Ser Gln Leu Glu Glu Val Phe His Ser Glu Lys Glu Thr Lys
50 55 60

Ser Ser Arg Ile Lys Ala Glu Glu Lys Glu Val Ile Glu Asn Thr Glu
65 70 75 80

Ala Val His Gln Gln Phe Gln Lys Phe Leu Thr Glu Ile Ser Lys Leu
85 90 95

Thr Asn Asp Tyr Glu Leu Asn Ile Thr Asn Arg Leu Phe Gly Glu Lys
100 105 110

Thr Tyr Leu Phe Leu Gln Lys Tyr Leu Asp Tyr Val Glu Lys Tyr Tyr
115 120 125

His Ala Ser Leu Glu Pro Val Asp Phe Val Asn Ala Ala Asp Glu Ser
130 135 140

Arg Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Lys Thr Asn Glu Lys Ile
145 150 155 160

Lys Asp Leu Phe Pro Asp Gly Ser Ile Ser Ser Ser Thr Lys Leu Val
165 170 175

Leu Val Asn Met Val Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Asp Arg Glu Phe Lys
180 185 190

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Lys Glu Asn Thr Lys Glu Glu Lys Phe Trp Met Asn Lys Ser Thr Ser
 195 200 205

Lys Ser Val Gln Met Met Thr Gln Ser His Ser Phe Ser Phe Thr Phe
 210 215 220

Leu Glu Asp Leu Gln Ala Lys Ile Leu Gly Ile Pro Tyr Lys Asn Asn
 225 230 235 240

Asp Leu Ser Met Phe Val Leu Leu Pro Asn Asp Ile Asp Gly Leu Glu
 245 250 255

Lys Ile Ile Asp Lys Ile Ser Pro Glu Lys Leu Val Glu Trp Thr Ser
 260 265 270

Pro Gly His Met Glu Glu Arg Lys Val Asn Leu His Leu Pro Arg Phe
 275 280 285

Glu Val Glu Asp Gly Tyr Asp Leu Gln Ala Val Leu Ala Ala Met Gly
 290 295 300

Met Gly Asp Ala Phe Ser Glu His Lys Ala Asp Tyr Ser Gly Met Ser
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Ala Gln Lys Phe Leu His Ser Ser Phe Val
 325 330 335

Ala Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Thr Gly Ile Gly
 340 345 350

Phe Thr Val Thr Ser Ala Pro Gly His Glu Asn Val His Cys Asn His
 355 360 365

Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Glu Ser Asn Ser Ile Leu Phe
 370 375 380

Phe Gly Arg Phe Ser Ser Pro
 385 390

<210> 5

<211> 2831

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

accgtctctc caaaaacccg aggtctcgct aaaatcatca tggattcact tggcgccgctc 60

ERSATZBLATT (REGEL 26)

agcactcgac ttgggtttga tcttttcaaa gagctgaaga aaacaaatga tggcaacatc 120
ttcttttccc ctgtgggcat cttgactgca attggcatgg tctcctggg gacccgagga 180
gccaccgctt cccagttgga ggaggtgtt cactctgaaa aagagacgaa gagctcaaga 240
ataaaggctg aagaaaaaga gattgagaac acagaagcag tacatcaaca attccaaaag 300
tttttgactg aaataagcaa actcactaat gattatgaac tgaacataac caacaggctg 360
tttgagaaaa aaacatacct cttccttcaa aaatacttag attatgttga aaaatattat 420
catgcatctc tggaacctgt tgattttgta aatgcagccg atgaaagtcg aaagaagatt 480
aattcctggg ttgaaagcaa aacaaatgat gtggaaactg aggcacagag agtttaaata 540
acttgcccaa gattcctcag ctgataagag gcaaactgga tgctaacaga ggcactcgac 600
cccagagtct ggactcttaa ccatgaacct taatttatcc actgggataa ataggcgatg 660
ggcaaaatga gaacctcccc gtgattctg ccagcaaacc ctttgtcagc aaggccctca 720
gaaaaaatca aggacttggt cccagatggc tctattagta gctctacca gctggtgctg 780
gtgaacatgg tttattttta agggcaatgg gacagggagt ttaagaaaga aaatactaag 840
gaagagaaat tttggatgaa taagagcaca agtaaactg tacagatgat gacacagagc 900
cattccttta gcttcacttt cctggaggac ttgcaggcca aaattctagg gattccatat 960
aaaaacaacg acctaagcat gtttgtgctt ctgccaacg acatcgatgg cctggagaag 1020
ataatagata aaataagtcc tgagaaattg gtagagtgga ctagtccagg gcatatggaa 1080
gaaagaaagg tgaatctgca cttgccccgg tttgaggtgg aggacggtta cgatctacag 1140
gcggtcctgg ctgccatggg gatgggcgat gccttcagtg agcaciaaagc cgactactcg 1200
ggaatgtcgt caggctccgg gttgtacgcc cagaagtcc tgcacagttc ctttgtggca 1260
gtaactgagg aaggcaccga ggctgcagct gccaccggca taggctttac tgtcacatcc 1320
gccccaggtc atgaaaatgt tcaactgcaat catcccttcc tgttcttcat caggcacaat 1380
gaatccaaca gcatcctctt cttcggcaga ttttcttctc cttaagatga tcgttgccat 1440
ggcattgctg cttttagcaa aaaacaacta ccagtgttac tcatatgatt atgaaaatcg 1500

ERSATZBLATT (REGEL 26)

tccattcttt taaatgttgt ctcacttgca tttccagtct tggccatcaa atcaatgatt 1560
taatgactcc aataatgtgt gtgtttataa ccatcctcga aagtgaatg tccttttttt 1620
tgtgccatgc gtaaggtgag tcaaaccaaa cctcattgat aatctcccct ttggtttcct 1680
ttgaaagtaa attggtatct tgtagttttg tgcacacgaa aggagagaaa gtttctccag 1740
taaagagtac gaactagtaa ttttgggggg tctctctaatt tctggtattt tgacatgta 1800
taatacgcaa gtaaaataaa acaatagttt actcagctca tgttactatt cccaacaga 1860
tattgtggca aatcacacat aggaaagagg atttgggaat acagtagcaa aacataaatt 1920
aaaactcaaa tgcccaggac aaaataaaac aatataccag atggagagga tgcccgtatt 1980
ttcatcttcc attctaacat tatccattgt tagatgcata agcattttga tattgtgtaa 2040
taaagtgtgt atttgagaag ataaatgatg tagttgatca gtaatcctcc tctatcacct 2100
ttttagactt tgtaaggtaa atatttgac taacttttag aaaagtttcc ctttttttct 2160
ccatttacat ttttctggtt tttttttttt tttttgagtg aggtacgagt attaccaaatt 2220
gatattttct gaagatgctt tttggaaagc tctgaatcta tacctaattg tcttaattat 2280
tggtttgttt catttttttc ctccagtttt taacaagatc acataactgg cttattttta 2340
acagctttgt caaactacaa tttacatgcc gtaaaatgta cacactgtaa ttttataatt 2400
cattgacttt tagtaaattt tctagcgta tgcacgcca caatccagtt ttagaatatt 2460
tccatgaccc taagaagttt cctcatgtct attaatatte ccaatcctag gcaccactga 2520
gttgttttct gtctttataa gtttttcttt ctacatctta tataaatgga atcataatac 2580
atgtagtatt ttgtgtctgg cgtcttgac ttagcatggt gttcttgagg ttcactctgt 2640
gtagtatgta ttgatactta ggattttttt attgccgaat actattccat tgcattggaaa 2700
agacctattt tatttctagg ttcaccagtt gagggacatt tggattgttc ccacttcttg 2760
ggctgttagg aataatgttg ctctgaacat gtaaaataaag atctttgtgt tcaaaaaaaaa 2820
aaaaaaaaa a 2831

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/02148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 C07K14/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ABTS H F ET AL: "Analysis of UVB-modulated gene expression in human keratinocytes by mRNA differential display polymerase chain reaction." PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, (1997 SEP) 66 (3) 363-7. , XP002116300 page 265, column 1, line 20 - line 24 page 236, column 2, line 30 - line 31 ---	1-20
X	DATABASE GENBANK [Online] accession no. X98307, 1 July 1996 (1996-07-01) ABTS ET AL.: "Analysis of UV-B modulated gene expression ..." XP002116301 abstract --- -/--	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 1999

Date of mailing of the international search report

15.10.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hardon, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/02148

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,0	<p>ABTS, HARRY F. (1) ET AL: "Repression of cellular genes by UVB radiation: A new mechanism in the UVB response of human keratinocytes."</p> <p>JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, (APRIL, 1998) VOL. 110, NO. 4, PP. 494.</p> <p>MEETING INFO.: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL INVESTIGATIVE DERMATOLOGY COLOGNE, GERMANY MAY 7-10, 1998 THE SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, INC.. ,</p>	1-20
E	<p>--- DE 197 42 725 A (ABTS HARRY FRANK DR) 1 April 1999 (1999-04-01)</p>	1-20
A	<p>--- WO 97 14425 A (GEN HOSPITAL CORP ;SHISEIDO CO LTD (JP)) 24 April 1997 (1997-04-24) -----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .
PCT/EP 99/02148

B x I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 4, 21
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/02148

Continuation of Box I.2

Claims: 4, 21

Claims 4: SEQ ID is missing in the documents originally filed
Claim 21: unclearly worded

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/02148

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19742725 A	01-04-1999	NONE	
WO 9714425 A	24-04-1997	AU 7447996 A	07-05-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02148

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/11 C07K14/81

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ABTS H F ET AL: "Analysis of UVB-modulated gene expression in human keratinocytes by mRNA differential display polymerase chain reaction." PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY, (1997 SEP) 66 (3) 363-7. , XP002116300 Seite 265, Spalte 1, Zeile 20 - Zeile 24 Seite 236, Spalte 2, Zeile 30 - Zeile 31 ---	1-20
X	DATABASE GENBANK [Online] accession no. X98307, 1. Juli 1996 (1996-07-01) ABTS ET AL.: "Analysis of UV-B modulated gene expression ..." XP002116301 Zusammenfassung --- -/-	1-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. September 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15. 10. 99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Hardon, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02148

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,0	ABTS, HARRY F. (1) ET AL: "Repression of cellular genes by UVB radiation: A new mechanism in the UVB response of human keratinocytes." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, (APRIL, 1998) VOL. 110, NO. 4, PP. 494. MEETING INFO.: ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL INVESTIGATIVE DERMATOLOGY COLOGNE, GERMANY MAY 7-10, 1998 THE SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, INC... , ---	1-20
E	DE 197 42 725 A (ABTS HARRY FRANK DR) 1. April 1999 (1999-04-01) ---	1-20
A	WO 97 14425 A (GEN HOSPITAL CORP ;SHISEIDO CO LTD (JP)) 24. April 1997 (1997-04-24) -----	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/02148

F Id I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 4, 21
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

F Id II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 4, 21

Anspruch 4: SEQ ID fehlt in den ursprünglich eingereichte Unterlagen,
Anspruch 21: sprachlich unklar.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/02148

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
--	-------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

DE 19742725 A	01-04-1999	KEINE	
WO 9714425 A	24-04-1997	AU 7447996 A	07-05-1997